

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica Y Biología Molecular II

**HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL ENTRE LAS FAMILIAS
PROTEICAS DE LAS CHAPERONINAS Y DE LAS SUBUNIDADES α
DEL COMPLEJO F₁-ATPASA**

Memoria que presenta el Licenciado
D. Agustín Alconada Rodríguez
para aspirar al grado de DOCTOR en FARMACIA
Madrid, Marzo 1993

DIRECTOR DE ESTA TESIS:

Prof. Dr. D. José Manuel Cuezva Marcos

LICENCIADO ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTOR

Agustín Alconada Rodríguez

José Manuel Cuezva Marcos, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Certifica que Agustín Alconada Rodríguez ha realizado bajo mi dirección el trabajo "*Homología Estructural y Funcional entre las Familias Proteicas de las Chaperoninas y de las Subunidades α del Complejo F_1 -ATPasa*"

Considera el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en la Facultad de Farmacia de Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid, el veinticuatro de Marzo de mil novecientos noventa y tres.

José Manuel Cuezva Marcos

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid (Enero 1989-Abril 1993) con fondos provistos por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, proyecto PM89-0061, y por la Comunidad Autónoma de Madrid, proyectos C150/90 y C032/92.

Durante este periodo, el Licenciado D. Agustín Alconada Rodríguez ha disfrutado de una Beca predoctoral de Formación de Personal Científico e Investigador" del Ministerior de Educación y Ciencia (Enero, 1989 - Diciembre, 1992) y de un contrato asociado al proyecto C150/90 de la Comunidad Autónoma de Madrid (Enero 1993 - Abril 1993).

Parte de los resultados presentados en este trabajo han sido publicados en las siguientes revistas y libros:

Luis, A.M.; Alconada, A. y Cuezva, J.M. "*The α regulatory subunit of the mitochondrial F1-ATPase is a heat-shock protein. Identification of two highly-conserved amino acid sequences among the α -subunits and molecular chaperones*" (1990) **J.Biol.Chem.** 265, 7713-7716.

Alconada, A. y Cuezva, J.M. "*A chaperonin protein module involved in recognition of interactive protein surfaces?*" (1993) **TIBS** 18, 81-82

Santarén, J.F.; Alconada, A. y Cuezva, J.M. "*Examination of processing of the rat liver mitochondrial F1-ATPase β -subunit precursor protein by high-resolution 2D-gel electrophoresis*" (1993) **J.Biochem.** 113, 129-131

Cuezva, J.M.; Flores, A.I., Santarén, J.F. y Alconada, A. "*Molecular chaperones and the biogenesis of mitochondria and peroxisomes*" (1993) **Biol.Cell.** en prensa.

Cuezva, J.M.; Alconada, A.; Izquierdo, J.M.; Luis, A.M.; Ostronoff, L.K.; Marín, A. y Flores, A.I. "*The unknown ubiquity of mitochondrial F1-ATPase α -subunit. A stress protein involved in organelle biogenesis.*" (1991) **En: Recent Advances in cellular and molecular biology.** (Wegmann, R.J., Wegmann, M.A., eds) Peeters Press, Bélgica.

Por último, estos resultados se han presentado como comunicaciones en un Congreso Nacional y tres Congresos Internacionales.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a Pepe Cuezva por haberme brindado la oportunidad de colaborar en su línea de investigación y por haberme enseñado, entre otras muchas cosas, a perseverar en el trabajo y a no desanimarme cuando las cosas se ponían "cuesta arriba".

Agradezco a todos los compañeros de laboratorio (por orden de aparición: Ana Luis, Margarita Chamorro, Carmen Valcarce, José María Izquierdo (JJ), Ana Cenarro, Carmen Blanco, Luciana K. Ostronoff, Ana Marín, Ana Flores, Javier Ricart y Antonio Liras) por haber contribuido a crear un ambiente agradable de trabajo. Así mismo, me gustaría reincidir en mi gratitud hacia aquellas personas que han colaborado más directamente conmigo (Ana Marín, Ana Cenarro, Carmen Blanco y Javier Ricart), aportando ideas, "manos" y, sobre todo, mucha ilusión; y a Margarita Chamorro, a pesar de su esfuerzo diario por ventilar el laboratorio, por ayudarme en todo lo posible.

Me gustaría expresar mi gratitud a todo el personal de laboratorio 460, por haber contribuido a que nuestra "estancia" en la cuarta planta fuera mucho más llevadera.

Agradezco:

Al Dr. M. Benito, por haber aceptado ser el Tutor de esta Tesis.

Al Dr. J. Ortín y a todo su equipo, por haberme admitido temporalmente en su laboratorio y por iniciarme en la técnicas de DNA recombinante.

Al Dr. L. Blanco, por su ayuda en los alineamientos múltiples de secuencia.

Al Dr. J. Vandekerckhove, por su indudable esfuerzo e interés en solucionar nuestros problemas con p57.

Al Dr. J.F Santarén, por la realización de los geles bidimensionales presentados en este trabajo.

A todo el personal de los distintos servicios técnicos del Centro de Biología Molecular (fotografía, ordenadores, instrumentación, animalario, mantenimiento) por haber contribuido entre todos a que el trabajo saliera adelante.

A Pedro González y Carmen San Martín por su inestimable ayuda en el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica. Un recuerdo muy especial para Pedro González, que por desgracia no ha podido ser testigo del final de este trabajo, en el que puso mucha ilusión y esfuerzo.

Al los sufridores diarios del "pollo" (Pepa, Pedro, Maria José, Manolo, Bárbara) por contribuir diariamente, con su buen humor, a que pudiera desconectar durante un rato de los agobios del trabajo.

Quiero agradecer a mis padres, a quienes va dedicada esta Tesis, por haberme apoyado y animado constantemente y porque, muy probablemente, sin su ayuda no hubiera sido capaz de llevar este trabajo a su fin.

Finalmente, agradezco a Gema por sus buenos consejos, por saber escuchar mis problemas, por su compañía, por haberme soportado en los malos momentos, por darme ánimos cuando más lo necesitaba y por otras muchas cosas que ella sabe bien y que se resumen en una: por haberme alegrado enormemente la existencia.

ABREVIATURAS

ams	Estabilidad alterada de mensajeros
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CTP	Citosín trifosfato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dubelcco
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etiléndiaminotetracético.
EGTA	Acido etilénglicol-bis-(amino-eter)-tetraacético
Hepes	Ácido N-2-hidroxietil-N'-2piperazínetanolsulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
hsp	Proteína de estrés térmico
IEF	Isoelectroenfoque.
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	kilodalton
KLH	Hemocianina de Megathura crenulata
MIM	Membrana interna mitocondrial
MPP	Proteína procesadora de matriz
NEPHGE	Electroforesis de no equilibrio en gradientes de pH
PEP	Proteína activadora del procesamiento
Pipes	Piperacina-N,N'-bis (2-etano-ácido sulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF	Polivinil difluorideno
RE	Retículo endoplásmico
rpm	revoluciones por minuto
RSBP	Proteína de unión a la subunidad de Rubisco
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
TBS	Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 0,15M
TCA	Ácid tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' tetrametilendiamida
TFA	Acido trifluoroacético
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	23
1.1. Estrés celular.....	23
1.1.1. Agentes inductores de la respuesta a estrés.....	23
1.1.2. Alteraciones en las células sometidas a estrés.....	25
1.1.2.1. Alteraciones estructurales.....	25
1.1.2.2. Alteraciones bioquímicas.....	26
1.1.2.3. Fenocopias.....	27
1.2. Proteínas de estrés.....	28
1.2.1. Proteínas de estrés de bajo peso molecular.....	30
1.2.2. Proteínas de estrés de 60 kDa (chaperoninas).....	30
1.2.2.1. Clasificación y características generales.....	31
1.2.2.2. Mecanismo de acción de las chaperoninas.....	37
1.2.3. Proteínas de estrés de 70 kDa.....	39
1.2.3.1. Clasificación de las proteínas de estrés de 70 kDa.....	40
1.2.3.2. Estructura de las hsp70s.....	46
1.2.3.3. Mecanismo de acción de las hsp70s.....	47
1.2.3.4. Cooperación funcional entre las proteínas de estrés de 60 y 70 kDa en el plegamiento polipeptídico.....	48
1.2.4. Proteínas de estrés de 90 kDa.....	50
1.2.5. Otros chaperones moleculares.....	50
1.3. Importación de proteínas a la mitocondria.....	54
1.3.1. Precursores proteicos mitocondriales.....	56
1.3.2. Síntesis de precursores y estabilización de éstos en el citosol.....	56
1.3.3. Interacción con receptores de la membrana externa mitocondrial.....	57
1.3.4. Canales de translocación de proteínas.....	59
1.3.5. Transporte y maduración de precursores en la matriz mitocondrial.	59
1.3.6 Transporte de precursores a distintos compartimentos submitocondriales.....	61

1.3.6.1. Transporte de precursores a la membrana externa mitocondrial.....	61
1.3.6.2. Transporte de precursores al espacio intermembrana.....	62
1.3.6.3. Transporte de precursores a la membrana interna mitocondrial.....	64
1.4. ATPasas translocadoras de iones.....	65
1.4.1. Aspectos generales.....	65
1.4.2. Clasificación de ATPasas translocadoras de iones.....	66
1.4.2.1. P-ATPasas.....	68
1.4.2.2. V-ATPasas.....	69
1.4.2.3. F-ATPasas.....	72
1.4.3. Evolución de las ATPasas translocadoras de iones.....	77
1.4.3.1. Hipótesis endosimbionte.....	81
1.4.3.2. Desarrollo del sistema de citomembrana en células eucariotas.....	82
1.5 Bibliografía.....	85
 2. INTRODUCCION.....	 111
 3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	 125
 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 135
4.1.1. Animales de experimentación, líneas celulares y cepas bacterianas.....	135
4.1.1.1. Ratas.....	135
4.1.1.2. Conejos.....	135
4.1.1.3. Drosophila.....	135
4.1.1.4. Líneas celulares.....	135
4.1.1.5. Cepas bacterianas.....	135

4.1.1.6. Vectores de clonación.....	136
4.1.2. Productos.....	136
4.2. Métodos.....	137
4.2.1. Fraccionamiento subcelular de hígado de rata.....	137
4.2.1.1. Homogeneizado de hígado.....	137
4.2.1.2. Aislamiento de mitocondrias.....	138
4.2.1.2.1. Por centrifugación diferencial.....	138
4.2.1.2.2. Por gradiente de sacarosa.....	138
4.2.1.2.3. Por gradiente de Nycodenz.....	138
4.2.1.3. Aislamiento de peroxisomas.....	139
4.2.1.3.1. Por gradiente de sacarosa.....	139
4.2.1.3.2. Por gradiente de Nycodenz.....	139
4.2.1.4. Fraccionamiento submitocondrial.....	139
4.2.1.4.1. Solubilizado mitocondrial.....	139
4.2.1.4.2. Obtención de mitoplastos.....	140
4.2.1.4.3. Obtención de vesículas de MIM.....	140
4.2.1.4.4. Purificación parcial de F1-ATPasa.....	140
4.2.1.5. Preparación de fracción citosólica.....	141
4.2.2. Preparación de matriz de eritrocitos de rata.....	141
4.2.3. Tratamiento de choque térmico de larvas de <i>Drosophila</i> <i>hydei</i>	141
4.2.4. Determinación de actividades enzimáticas.....	142
4.2.4.1. Actividad citocromo c oxidasa.....	142
4.2.4.2. Actividad catalasa.....	142
4.2.5. Fraccionamiento electroforético de proteínas.....	143
4.2.5.1. SDS-PAGE.....	143
4.2.5.2. Electroforesis bidimensional.....	143
4.2.5.2.1. Isoelectroenfoque/SDS-PAGE.....	143
4.2.5.2.2. NEPHGE/SDS-PAGE.....	143
4.2.5.3. Visualización de las proteínas fraccionadas.....	144
4.2.5.3.1. Tinción con azul de Coomassie.....	144
4.2.5.3.2. Tinción con plata.....	144
4.2.5.3.3. Fluorografía.....	144
4.2.5.3.4. Autoradiografía.....	144
4.2.6. Generación de anticuerpos.....	144
4.2.6.1. Anticuerpos contra péptidos sintéticos.....	144

4.2.6.3. Anticuerpos contra el polipéptido de 60 kDa inmunoprecipitado por el anticuerpo anti-F1-ATPasa.....	147
4.2.6.2. Anticuerpos purificados por afinidad.....	147
4.2.7. Análisis inmunológico de proteínas.....	150
4.2.7.1. Western blot.....	150
4.2.7.1.2. Transferencia a PVDF.....	150
4.2.7.1.3. Inmunodetección de proteínas.....	150
4.2.7.2. Inmunoprecipitación.....	151
4.2.7.2.1. Inmunoprecipitación directa.....	151
4.2.7.2.2. Inmunoprecipitación con proteína A- sepharosa.....	151
4.2.7.3. Cromatografía de inmunoafinidad.....	152
4.2.8. Análisis peptídico de proteínas y microsecuenciación.....	152
4.2.8.1. Digestiones con proteasa V8.....	152
4.2.8.2. Digestiones con tripsina.....	153
4.2.8.3. Digestiones con N-cloro succinimida.....	153
4.2.8.4. Digestiones con bromuro de cianógeno.....	155
4.2.8.5. Análisis de los fragmentos peptídicos mediante HPLC en fase reversa.....	155
4.2.8.6. Microsecuenciación.....	156
4.2.9. Tratamiento con endoglicosidasas de polipéptidos inmunoprecipitados.....	156
4.2.10. Estudios de plegamiento proteico.....	157
4.2.11. Análisis mediante electroforesis bidimensional del procesamiento de precursores mitocondriales.....	157
4.2.12. Técnicas de microscopía.....	158
4.2.12.1. Microscopía de inmunofluorescencia indirecta.....	158
4.2.12.2. Microscopía electrónica.....	158
4.2.13. Purificación de ácidos nucleicos.....	159
4.2.13.1. Aislamiento de RNA de hígado de rata y RNA poli A+.....	159
4.2.13.2. Aislamiento de DNA plasmídico.....	159
4.2.13.3. Aislamiento de DNA del fago λ gt11.....	159
4.2.14. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	159
4.2.14.1. Electroforesis de RNA.....	159
4.2.14.2. Electroforesis de DNA.....	159

4.2.15. Manejo de genotecas de cDNA de hígado de rata.....	160
4.2.15.1. Síntesis de una genoteca de cDNA de hígado de rata.....	160
4.2.15.2. "Screening" de una genoteca de expresión de cDNA de hígado de rata.....	160
4.2.16. Análisis de mensajeros.....	161
4.2.16.1. "Northern blot".....	161
4.2.16.2. Marcaje de cDNAs.....	161
4.2.16.3. Hibridación.....	162
4.2.17. Secuenciación de DNA.....	162
4.2.18. Análisis asistido por ordenador de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos.....	162
4.2.18.1. Análisis de estructura de proteínas.....	162
4.2.18.1.1. Estructura primaria. Alineamientos.....	162
4.2.18.1.2. Estructura secundaria.....	163
4.2.18.2. Análisis de secuencia de ácidos nucleicos.....	164
5. RESULTADOS.....	171
5.1. Caracterización de la relación evolutiva entre chaperoninas y subunidades α de las F-ATPasas.....	171
5.1.1. Homología estructural entre la familia proteica de las subunidades α del complejo F1-ATPasa y la familia de las chaperoninas.....	171
5.1.1.1 Identificación de 2 regiones aminoacídicas altamente conservadas entre ambas familias.....	171
5.1.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias de subunidades α y chaperoninas.....	176
5.1.1.3. Predicción y alineamiento de la estructura secundaria de las chaperoninas y subunidades α	180
5.1.1.4. Verificación del alineamiento múltiple de las chaperoninas y subunidades α . Inferencia de una secuencia consenso.....	184
5.1.2 Evidencias experimentales inmunológicas que apoyan la relación evolutiva entre chaperoninas y subunidades α	186

5.1.2.1 Generación de anticuerpos contra las regiones conservadas entre chaperoninas y subunidades α . Identificación de proteínas inmunoreactivas.....	186
5.1.2.2 Identificación de proteínas celulares inducibles por choque térmico en larvas de <i>D.melanogaster</i> que contienen uno de los dominios homólogos (DR-1) entre chaperoninas y subunidades α	189
5.1.3. Implicaciones funcionales de la identidad de secuencia entre chaperoninas y subunidades α	193
5.1.3.1 Identificación del posible dominio de las chaperoninas responsable del reconocimiento de superficies proteicas interactivas.....	193
5.1.3.2. Evidencias experimentales de la capacidad del péptido sintético DR-2 (región VIII, Fig. 1) para interferir en los procesos de plegamiento proteico.....	196
5.1.3.2.1. Capacidad del péptido DR-2 para interferir en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas.....	196
5.1.3.2.2. Efecto del péptido DR-2 sobre la solubilidad de proteínas nativas.....	201
5.1.4. Intento de clonaje del cDNA correspondiente a la subunidad α del complejo F1-ATPasa mitocondrial.....	205
5.1.5. Implicaciones evolutivas de la homología funcional y estructural entre chaperoninas y subunidades α	209
5.1.6. Identificación y caracterización molecular del polipéptido de 57 kDa, previamente considerado α -F1-ATPasa, en localizaciones extramitocondriales.....	219
5.1.6.1. Caracterización de la naturaleza molecular de p57: donde se demuestra que esta proteína corresponde a catalasa.....	220
5.1.6.1.1. Estudios de inmunomicroscopía electrónica e inmunofluorescencia indirecta.....	220
5.1.6.1.2. Caracterización de la proteína inmunoreactiva común a mitocondrias, eritrocitos y peroxisomas.....	221
5.1.6.1.3. Mapeo peptídico de p57.....	224

5.1.6.1.3.1. Proteólisis enzimáticas.	
Proteasa V8 y tripsina.....	226
5.1.6.1.3.2. Proteólisis químicas.	
Bromuro de cianógeno y N-	
cloro succinimida/urea.....	228
5.1.6.1.4. Microsecuenciación de péptidos resultantes	
de la digestión trípica de p57.....	229
5.1.7. Caracterización preliminar de la catalasa de mitocondria de hígado	234
de rata.....	
5.1.7.1. Caracterización de la catalasa de mitocondria de hígado	
de rata como un proteína propia de este orgánulo y no	
como una contaminación peroxisomal.....	234
5.1.7.1.1. Fraccionamiento	
subcelular.....	234
5.1.7.1.2. Localización subcelular mediante	
immunomicroscopía	
electrónica.....	237
5.1.7.2. Análisis mediante electroforesis bidimensional de	
catalasa de mitocondria, eritrocitos y	
peroxisomas.....	244
5.1.7.2.1 Identificación de las isoformas de	
catalasa.....	240
5.1.7.2.2. Estudio mediante electroforesis	
bidimensional de la posible glicosilación de	
las isoformas de catalasa.....	244
5.1.7.3. La catalasa mitocondrial tiene una migración	
electroforética ligeramente inferior (2 kDa) a la de	
eritrocito y peroxisoma.....	246
5.1.8. Causas e implicaciones de la identificación de catalasa inactiva en	
la mitocondria de hígado de rata.....	248
5.2. Desarrollo de un sistema experimental de alta sensibilidad que permita la	
identificación y caracterización del procesamiento de precursores	
mitocondriales.....	255
6. DISCUSION.....	265

7. CONCLUSIONES.....	281
8. BIBLIOGRAFÍA.....	285

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1. ESTRÉS CELULAR

Una característica esencial de todos los seres vivos es su capacidad para detectar y responder a las variaciones en su entorno normal de crecimiento mediante una serie de mecanismos complejos que garantizan el mantenimiento de la homeostasia.

A nivel celular, los mecanismos que permiten la respuesta y/o el aclimataamiento a cambios suaves en el entorno normal de crecimiento incluyen, a corto plazo, cambios reversibles en la estructura y función de los enzimas, lo que a su vez puede alterar la especificidad o direccionalidad de ciertas rutas metabólicas y, a largo plazo, modificaciones en el patrón de expresión génica con la siguiente alteración cualitativa y cuantitativa del contenido proteico celular, mecanismo éste que contribuye a la exitosa adaptación definitiva del ser vivo al nuevo entorno.

Sin embargo, cuando las variaciones que un ser vivo experimenta en su entorno normal de crecimiento son de tal magnitud que sobrepasan su capacidad fisiológica de respuesta, aparece otro tipo de respuesta celular, de igual o mayor importancia que la anterior y que se conoce con el nombre genérico de respuesta al estrés. Este tipo de respuesta aparece en todos los seres vivos estudiados hasta la fecha y se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución, tanto en cuanto a sus mecanismos como a los componentes moleculares implicados.

A nivel celular, el principal componente de la respuesta al estrés lo constituye el aumento rápido y preferencial en la expresión coordinada de un conjunto de proteínas conocidas genéricamente como proteínas de estrés, cuya función parece ser la de proporcionar protección a la célula, a la vez que contribuir a recuperar las funciones metabólicas básicas que se vieron afectadas durante el periodo de estrés. Ashburner y Borner (1979), Craig (1985), Lindquist (1986), Subject and Shyy (1986) y Lindquist y Craig (1988) han publicado revisiones exhaustivas sobre este tema.

1.1.1. Agentes inductores de la respuesta a estrés.

Aunque la respuesta a estrés fue inicialmente identificada como una serie de alteraciones morfológicas en respuesta a aumentos en la temperatura normal de

crecimiento de ciertos organismos, se conocen en la actualidad multitud de situaciones fisiológicas y patológicas capaces de desencadenar una respuesta celular semejante.

Todas estas situaciones pueden agruparse en las siguientes tres grandes categorías:

- 1.- Situaciones de estrés ambiental: Este tipo de condiciones incluye el choque térmico (Ritossa, 1964), exposición de la célula a análogos de aminoácidos (Kelley y Schlesinger, 1978; Hightower, 1980), a ciertos metales pesados (Levinson y col., 1980), a algunos ionóforos (Wu y col. 1981), a inhibidores de metabolismo energético (Ritossa, 1962), a inhibidores de la síntesis de glicoproteínas (Poyssegur y col., 1977; Olden y col. 1978), así como a la alteración del pH del medio extracelular (Whelan y Hightower, 1985).
- 2.- Situaciones patofisiológicas: Fiebre, hipertrofia, hiperoxia, inflamación, isquemia, tratamientos con agentes antineoplásicos (Shaefer y col., 1988), infecciones virales (Notarianni y Preston, 1982; Peluso y col., 1978) y expresión anormal de proto-oncogenes y oncogenes (Morange y col., 1984; Peluso y col., 1978).
- 3.- Situaciones no estresantes: ciclo celular, factores de crecimiento, desarrollo y diferenciación (revisado por Morimoto y Milarski, 1990; y por Pauli y Tissieres, 1990).

El choque térmico fue el primer agente identificado capaz de promover la respuesta al estrés (Ritossa, 1962, 1963, 1964), razón por la que ha constituido el modelo experimental empleado tradicionalmente para el estudio de este tipo de respuesta en distintos organismos. Por este motivo, los términos respuesta a estrés y respuesta a choque térmico son utilizados con frecuencia de forma indistinta en la literatura, y la gran mayoría de las proteínas inducidas por estrés han sido denominadas proteínas de choque térmico (hsps).

A pesar de la naturaleza aparentemente dispar de todos los agentes capaces de desencadenar la respuesta al estrés, muchos de ellos presentan como denominador común la capacidad de provocar alteraciones en la conformación de proteínas. Por esta razón, se podría afirmar que el agente causante en último término de la aparición de la respuesta al estrés es la acumulación intracelular de polipéptidos estructuralmente anormales. Este hipótesis se apoya en numerosas evidencias experimentales (Ananthan y col., 1986; Kozutsumi y col., 1988; Edington y col., 1989; Parsell y Sauer, 1989; Goff y Goldberg, 1985).

1.1.2. Alteraciones en las células sometidas a estrés.

Las alteraciones bioquímicas y estructurales que aparecen en las células sometidas a estrés han sido objeto de una activa labor investigadora. La mayor parte de los estudios realizados en este sentido han sido de naturaleza meramente descriptiva y se han efectuado en su mayor parte sobre células eucariotas en cultivo. Es importante considerar que la aparición de una alteración determinada en una célula sometida a estrés puede resultar bien de un efecto directo del estrés o bien ser debida a un mecanismo celular tendente a compensar una alteración previa, por lo que los datos obtenidos de la observación directa de la célula deben ser tomados con cautela.

1.1.2.1. Alteraciones estructurales.

En células de mamíferos, el núcleo parece ser el orgánulo más afectado por el estrés, probablemente debido a la mayor susceptibilidad de los complejos ácido nucleico/proteína a sufrir desnaturalización y agregación (Littlewood y col., 1987). Las siguientes alteraciones son características de los núcleos de células sometidas a estrés:

- Aparición de los denominados gránulos pericromatínicos dispersos por todo el núcleo (Heine y col., 1971), constituidos probablemente por agregados de pre-mRNAs no procesados (Mayrand y Pedersen, 1983; Yost y Lindquist, 1986).
- En los nucleolos se produce una pérdida y/o agregación de los denominados complejos granulares, constituidos éstos por prerribosomas y otros complejos ribonucleoproteícos en formación (Welch y Suhan, 1985; Neumann y col., 1984).
- Aparición de filamentos cilíndricos de actina que forman fibras densamente empaquetadas y que atraviesan el núcleo de un extremo a otro (Iida, 1986; Welch y Suhan, 1985).

El citoplasma también sufre profundas alteraciones a causa del estrés, viéndose afectados principalmente los distintos componentes del citoesqueleto. Así, se produce un aumento aparente en el número de microfilamentos de actina en respuesta a choque térmico (Thomas y col., 1982), aunque se han descrito independientemente efectos totalmente opuestos a consecuencia del mismo tipo de estímulo (Glass y col., 1985). Los filamentos intermedios sufren una rápida redistribución intracelular en respuesta a la hipertermia, pasando de una disposición fisiológica extendida por todo el citoplasma a una distribución

anormal colapsada en torno al núcleo (Welch y col., 1985; Thomas y col., 1982). Se ha sugerido que el mecanismo responsable del colapso de los filamentos intermedios durante el choque térmico es la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) (Escribano y Rozengurt, 1988), puesto que se ha observado en células sometidas a estrés la fosforilación de 2 residuos en la molécula de vimentina, fosforilación ésta que puede ser catalizada por la PKA (Lamb y col., 1989). Se desconocen por el momento las implicaciones funcionales originadas por la alteración estructural que sufren los filamentos intermedios durante el choque térmico. Se ha observado la aparición de mitocondrias y polisomas asociados a los agregados perinucleares de filamentos intermedios que se forman durante el choque térmico (Thomas y col., 1982).

Otros orgánulos que sufren profundas alteraciones estructurales durante el choque térmico son el aparato de Golgi y las mitocondrias. El aparato de Golgi experimenta, en respuesta al tratamiento hipertérmico, una fragmentación dando lugar a un conjunto de vesículas membranosas distribuidas por todo el citoplasma celular (Welch y Suhan, 1985). Sin embargo, no se ha demostrado de forma concluyente el que esta profunda alteración estructural conlleve disfunciones en la actividad secretora y de glicosilación proteica en la célula estresada. Por otro lado, las mitocondrias de fibroblastos sometidos a choque térmico aparecen hinchadas, con unas crestas muy prominentes y los espacios intracrestales muy aumentados (Welch y Suhan, 1985). Este tipo de alteraciones estructurales son muy semejantes a las producidas por agentes inhibidores del transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa (Weinbach y Garbus, 1968; Buffa y col., 1970).

1.1.2.2. *Alteraciones bioquímicas.*

Numerosos autores han estudiado el efecto del tratamiento hipertérmico sobre la composición de la membrana plasmática en células de eucariotas superiores. Sin embargo, los resultados de los distintos grupos han sido contradictorios. Por un lado, se ha sugerido que las células previamente hechas termotolerantes presentan un aumento en el contenido de colesterol en la membrana plasmática (Cress y col., 1982), mientras que Anderson y Parker (1982) concluyeron que la termotolerancia no conlleva cambios apreciables en la fluidez y composición de la membrana.

Sin embargo, la alteración funcional de ciertos componentes de la membrana en respuesta a choque térmico parecen ser mucho más evidentes. Así, por ejemplo, se han demostrado (i) una alteración de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa (Yi, 1979; Burdon y Cutmore, 1982; Anderson y Hahn, 1985) originándose un aumento en la concentración

intracelular de K^+ acompañado de una disminución en la de Na^+ , (ii) una disminución en la capacidad de "binding" del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Magnum y Fernie, 1981) y del receptor de insulina (Calderwood y Hahn, 1983), (iii) una reducción del número de antígenos de histocompatibilidad en la superficie celular (Mehdi y col., 1984) y (iv) un aumento en el transporte de hexosas al interior celular (Warren y col., 1986).

Existen numerosos datos que indican que una consecuencia temprana del choque térmico es una disminución rápida del pH intracelular (Weitzel y col., 1985) y un aumento de los niveles intracelulares de calcio (Stevenson y col., 1986). La sugerencia inicial de que el cambio en dichos parámetros podría ser responsable del aumento en la transcripción de los genes que codifican para proteínas de choque térmico fue rebatida por Drummond y col. (1986) al demostrar que cambios en estos parámetros, en ausencia de choque térmico, no originan activación transcripcional. En la actualidad, el significado de la alteración en el pH y en la concentración de calcio intracelulares permanece desconocido.

Otro efecto característico de la hipertermia es la disminución en la concentración intracelular de ATP (Leenders y col., 1974; Findly y col., 1983), efecto que parece estar asociado a la alteración estructural de la mitocondria. No resulta extraño por tanto que el choque térmico vaya acompañado de una disminución en la funcionalidad mitocondrial (Christiansen y Kuama, 1969) y que la célula adquiera vías anaerobias para su aprovisionamiento energético. Como respuesta adaptativa paralela a estas alteraciones, se ha observado que la expresión de dos enzimas glucolíticas, enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se ve aumentada durante el choque térmico (Iida y Yahara, 1985).

1.1.2.3. *Fenocopias.*

Las fenocopias son anomalías no heredables del desarrollo inducidas por estrés ambiental y que cursan con unas manifestaciones muy semejantes a las que aparecen en ciertos mutantes para genes homeóticos implicados en el desarrollo embrionario. Las fenocopias se manifiestan únicamente cuando el estrés se produce en etapas concretas del desarrollo del organismo, y pueden ser inducidas tanto por la hipertermia como por la exposición a ciertos agentes químicos (etanol). Aunque este fenómeno fue identificado por primera vez en *Drosophila* (Goldschmidt, 1935), también se ha observado en embriones de ave y de mamíferos (Pleet y col., 1981).

1.2. PROTEÍNAS DE ESTRÉS.

Las proteínas de estrés constituyen una amplia familia de polipéptidos presentes en todos los organismos estudiados hasta la fecha y cuyo denominador común es que su síntesis aumenta de forma drástica y preferencial durante una situación de estrés ambiental. La clasificación de las proteínas de estrés se puede efectuar en base a 2 criterios:

- Según el agente inductor, hablamos de "heat-shock proteins" (hsp, proteínas inducidas por choque térmico) o de "glucose-regulated proteins" (grp, proteínas inducidas por deficiencia de glucosa). El resto de agentes inductores de la respuesta al estrés promueve la síntesis de uno, otro o ambos grupos de proteínas. De esta forma, en células de mamíferos, la exposición a metales pesados desencadena una respuesta celular muy semejante a la que aparece durante el choque térmico mientras que la hipoxia, el tratamiento con ionóforos de calcio o con inhibidores de la glicosilación provoca la inducción de las grps, de forma análoga a lo que sucede en una situación de deficiencia de glucosa.
- Según similitud de secuencia y peso molecular, se distinguen 4 grandes familias de proteínas de estrés:
 - Proteínas de estrés de bajo peso molecular.
 - Proteínas de estrés de 60 kDa.
 - Proteínas de estrés de 70 kDa.
 - Proteínas de estrés de 90 kDa.

Las proteínas de estrés de 60, 70 y 90 kDa se conocen genéricamente como chaperones moleculares. Este término fue propuesto inicialmente por Laskey (1978) para ilustrar el papel de la nucleoplasmina en el ensamblaje de nucleosomas, y posteriormente reinterpretado por Ellis y col. (1987) para hacerlo extensible a todas aquellas proteínas que intervienen en el plegamiento y ensamblaje de otros polipéptidos pero que no forman parte del complejo funcional que resulta. Las proteínas de estrés de 60 kDa se conocen también como chaperoninas. Recientemente se han publicado varias revisiones exhaustivas sobre el tema (Gething, 1991; Gething y Sambrook, 1992; Rothman, 1989; Georgopoulos, 1992; Hartl y col., 1992 y Kelley y Georgopoulos 1992. En la tabla 1.1 se muestra una relación sistematizada de los chaperones moleculares identificados hasta la fecha en distintos organismos, así como de las proteínas que cooperan con éstos.

TABLA 1.1. Clasificación de los chaperones moleculares y de los factores proteicos que cooperan en su función (co-chaperones)

Familia		Procariontes	Levaduras			Eucariotas superiores				Funciones
			Citosol	Mitocondria	Retículo endoplásmico	Citosol	Mitocondria	Retículo endoplásmico	Cloroplasto	
Familia hsp70	Chaperon	DnaK	Ssa(1-4)p Ssb(1-2)p	Ssc1p	Kar2p (grp78)	Hsp70 Hsc70 Prp73	grp75	BiP	cl-hsp70	Unirse a y mantener el estado desplegado de polipéptidos, liberándolos tras la hidrólisis de ATP
	Co-chaperon	DnaJ GrpE	YDJ1, Sis1p	SCJ1p ^a	Sec63 ^b	HSJ1 ^c				
Familia hsp60	Chaperon	GroEL, RSBP (α , β) ^d TF55 ^e		Hsp60		TRiC, TCP1 ^e	Hsp58		RSBP (α , β)	Unirse a polipéptidos desplegados y promover su plegamiento correcto
	Co-chaperon	GroES		Hsp10			Hsp10		Hsp12 ^f	
Familia hsp90	Chaperon	HspG (C62.5)	Hsp83, Hsc83			Hsp90		Grp94 (ERP94)		Unirse a polipéptidos desplegados para prevenir su función (p.ej. receptor hormonas esteroideas) o dirigirlos al compartimento adecuado (p.ej. pp60 ^{v-src})
	Co-chaperon					Hsp56 ^g				
Familia secB	Chaperon	SecB, Trigger factor	SRP			SRP				Unirse a cadenas polipeptídicas nacientes, dirigirlos hacia la membrana y contribuir a su translocación.
	Co-chaperon	SecA, SecY/E	Docking protein, SecE1			Docking protein, SSR				
Otros		PapD				PBFs				

a- La existencia de interacciones funcionales entre SCJ1p y Ssc1p en la mitocondria no ha sido demostrada.

b- Sec63 es una proteína integral de membrana del ER cuyo dominio luminal tiene ciertas homologías con DnaJ, aunque su interacción con Grp78 no ha sido demostrada.

c- HSJ1 es una proteína homóloga a dnaJ localizada en tejido neuronal de la que se desconoce su función.

d- RSBP aparece sólo en procariontes fotosintéticos.

e- TF55 y TRiC/TCP1 constituyen una familia de proteínas homólogas funcionalmente equivalentes a las chaperoninas (hsp60, GroEL y RSBP) pero localizadas en arqueobacterias (TF55) y en el citosol de eucariotas (TCP1)

f- No se ha comprobado de forma inequívoca que el homólogo de cpn10 en mitocondrias de levaduras y cloroplastos interaccione con hsp60 en sus respectivos compartimentos.

g- Hsp56 es una proteína con actividad peptidil prolil cis-trans isomerasa que aparece asociada *in vivo* a hsp90.

1.2.1. **Proteínas de estrés de bajo peso molecular.**

Todos los organismos estudiados hasta la fecha contienen una o más hsp de bajo peso molecular. Aunque aparentemente constituyen un grupo heterogeneo de polipéptidos, pueden considerarse integrantes de una misma familia en función a : (i) presentan una discreta similitud de secuencia, (ii) poseen una estructura secundaria e hidrofobicidad semejante, (iii) manifiestan una expresión diferencial en distintos estadios del desarrollo, (iv) forman partículas multiméricas de gran tamaño, algunas de las cuales contienen RNA y (v) presentan una distribución subcelular semejante. Se han identificado proteínas de esta familia en una gran variedad de organismos (ver Lindquist y Craig, 1988 y Welch, 1990).

La mayor parte de las proteínas de bajo peso molecular de distintas especies presentan cierta semejanza de secuencia con la α -cristalina (Bloemendal y col., 1972), una proteína localizada en el cristalino en forma de agregados de alto peso molecular. Dado que las proteínas de estrés de bajo peso molecular se presentan habitualmente como oligómeros, se ha sugerido que la semejanza de secuencia entre ambas familias de proteínas puede constituir la base estructural de la capacidad de ambas familias para formar homoligómeros. Existen pocos datos referentes a la función de esta familia de proteínas. Estudios recientes han demostrado que la α -cristalina puede funcionar como un chaperón molecular (Horwitz, 1992).

1.2.2. **Proteínas de estrés de 60 kDa (chaperoninas).**

Esta familia comprende un amplio grupo de polipéptidos conocidos genéricamente como chaperoninas (Hemmingsen y col., 1988) y caracterizados por ser estructural y funcionalmente homólogos a la proteína GroEL de *E.coli* y por estar presentes en todos los procariotes y en mitocondrias y cloroplastos de células eucariotas (McMullin y Hallberg, 1987; McMullin y Hallberg, 1988). Las características comunes de esta familia de proteínas son las siguientes:

- Presentan una alta homología de secuencia (en torno al 50% de identidad aminoacídica entre 2 chaperoninas cualesquiera (Gupta, 1989).
- Aunque se expresan de forma constitutiva, son inducidas en respuesta a choque térmico (Ellis, 1990), al aumento en el contenido intracelular de proteínas en estado no nativo (Parsell y Sauer, 1989) y a infecciones bacterianas (Buchmeier y Heffron, 1990),

característica esta última que las convierte en potentes antígenos en distintos tipos de infecciones (Young y col., 1988), así como las hace potencialmente capaces de desencadenar procesos autoinmunes (Young y col., 1990).

- Todas ellas presentan una estructura homooligomérica, compuesta por 2 anillos de 7 subunidades de aproximadamente 60 kDa cada una (cpn60) (Martel y col., 1990; Pushkin y col., 1982). La chaperonina de cloroplastos (Rubisco Subunit Binding Protein) constituye una excepción ya que contiene cantidades equimolares de 2 subunidades (α y β), altamente relacionadas (Hemmingsen y Ellis, 1986). Las chaperoninas de procariotes y mitocondrias interaccionan funcionalmente con otra proteína de 10 kDa (cpn10) que se purifica en forma de homoheptámero con simetría de orden 7. Las subunidades cpn10 presentan cierta homología de secuencia con una región central (aminoácidos 100-250) de las subunidades cpn60 (Martel y col., 1990).

- Todas las chaperoninas estudiadas ligan ATP con gran afinidad pero presentan una débil actividad ATPasa, que en algunos casos puede verse modulada en presencia del sustrato polipeptídico y del componente cpn10.

- Todas ellas parecen estar implicadas en la estabilización conformacional de intermedios de plegamiento que aparecen en la célula, tanto de forma fisiológica (transporte a través de membranas, plegamiento, ensamblaje) como de forma patológica (heat-shock, glicosilación deficiente). De hecho, se han establecido sistemas experimentales de renaturalización proteica *in vitro* en los que las distintas chaperoninas funcionan de forma semejante.

1.2.2.1 Clasificación de las proteínas de estrés de 60 kDa

Chaperoninas bacterianas.

Fueron identificadas inicialmente en la década de los 70 en base a que mutaciones en sus genes codificantes eran capaces de bloquear el crecimiento y propagación de los fagos λ (Georgopoulos y col., 1973), T4 (Georgopoulos y col., 1972), T5 (Zweig y Cummings, 1973) y 186 (Hocking, 1982).

El complejo nativo y funcional según se aísla del citosol bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 25S y consta de 14 subunidades organizadas en forma de 2 anillos de 7 subunidades cada uno en torno a un eje de simetría de orden 7 (Hendrix, 1979). GroEL coopera funcionalmente tanto *in vivo* (Tilly y Georgopoulos, 1982) como

in vitro (Chandrasekar, 1986) con la proteína GroES (cpn10), una proteína de 10 kDa que aparece en forma nativa como un anillo homoheptamérico (Chandrasekar, 1986), y que se encuentra codificada junto con el gen de GroEL en el operón GroE, de donde se transcriben conjuntamente como un mRNA bicistrónico (Hemmingsen y col., 1988). La estequiometría de GroEL y GroES en la holochaperonina funcional es de 1:1 (Langer y col., 1992b). GroES interacciona de forma asimétrica con uno de los polos del complejo formado por GroEL, originando un acusado cambio conformacional en el polo opuesto (Langer et al., 1992b). Una orientación semejante de GroEL con respecto a GroES se ha observado en la holochaperonina de *Thermus thermophilus* (Ishii et al., 1992).

GroEL es una proteína abundante que representa el 2 % del contenido proteico celular total en condiciones basales, mientras que tras un choque térmico pasa a constituir el 16% (Neidhart y col., 1981).

Aunque las proteínas GroE fueron identificadas inicialmente como necesarias para la morfogénesis de distintos fagos, estudios posteriores demostraron que estas proteínas resultan esenciales para la viabilidad celular (Wada e Itikawa, 1984; Fayet y col., 1989). Las funciones descritas para las proteínas GroE son las siguientes:

- 1.- Son necesarias para la morfogénesis de distintos bacteriofagos. Ambas proteínas se requieren para el ensamblaje de la cabeza del fago λ (Friedman y col., 1984), la cola del fago T5 (Tilly y Georgopoulos, 1982) y la cabeza del fago T4 (Georgopoulos y col., 1972).
- 2.- Replicación del DNA: Se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas GroE es capaz de suprimir fenotipos termosensibles asociados a mutaciones en proteínas implicadas en la interacción con DNA (Fayet y col., 1986; Jenkins y col., 1986; Ruben y col., 1988), lo que sugiere la existencia de interacciones funcionales entre estas proteínas y GroES, aunque no se han encontrado evidencias concluyentes al respecto.
- 3.- Translocación de proteínas: Se han podido identificar complejos binarios estables entre GroEL y distintos precursores de secreción (pre β -lactamasa, cloranfenicol acetil-transferasa) en extractos celulares de *E.coli* (Bochkareva y col., 1988). Estos complejos también han podido ser reconstituidos *in vitro* a partir de GroEL y de los precursores proOmpA y prePhoE purificados (Lecker y col., 1989). Dichas asociaciones pueden ser revertidas en presencia de ATP (Bochkareva y col., 1988).

Además, la sobreexpresión de GroEL en *E.coli* facilita la exportación de proteínas de fusión con β -galactosidasa (Phillips y Silhavy, 1990).

- 4.- Plegamiento y ensamblaje de proteínas oligoméricas. Aunque no existen evidencias directas de que GroEL pueda promover el plegamiento y ensamblaje de proteínas endógenas de *E.coli in vivo*, se ha demostrado que la reconstitución de Rubisco dimérico y hexadecamérico a partir de sus subunidades expresadas en *E.coli* es mucho más eficiente en aquellas cepas en las que existe simultáneamente sobreexpresión de GroEL y GroES (Goloubinoff y col., 1989b). Por otro lado, la sobreexpresión de estas proteínas permite corregir multitud de fenotipos termosensibles en *S.typhimurium* y *E.coli* debidos a mutaciones en genes codificantes tanto para enzimas de distintas rutas biosintéticas como para proteínas estructurales (Van Dyk y col., 1988). Aunque existen varias hipótesis para explicar estos efectos supresores, parece razonable suponer que la proteína GroE está involucrada en el ensamblaje de polipéptidos, de forma que proteínas mutantes que no pueden adquirir una conformación funcional, son capaces de plegarse correctamente en presencia de un exceso de GroEL.

Chaperoninas de cloroplastos (Proteína de unión a la subunidad de Rubisco).

Fue identificada inicialmente por Barraclough y Ellis (1980) en un estudio sobre la síntesis y ensamblaje de la proteína RuBisCo, proteína presente en todos los organismos autótrofos encargada de catalizar la fijación fotosintética del CO₂ (Ellis, 1979). La RBSP (Rubisco Subunit Binding Protein) aparecía asociada no covalentemente a las subunidades mayores de Rubisco antes del ensamblaje de éstas para formar el oligómero funcional.

A diferencia de lo que ocurre en otras chaperoninas que contienen un único tipo de subunidad de 60 kDa, la RBSP contiene de dos clases de subunidades de 60 kDa, la α (61 kDa) y la β (60 kDa) (Hemmingsen y Ellis, 1986), de secuencia altamente conservada (identidad aminoacídica del 50%), por lo que probablemente derivan de un único gen ancestral (Martel y col., 1990). Tanto la subunidad α como la β están codificadas en el genoma nuclear (Hemmingsen y col., 1986). La estructura cuaternaria de la RBSP, a semejanza de lo que ocurre en otras chaperoninas, es de tetradecámero con una disposición en 2 anillos de 7 monómeros, en el que la disposición de las subunidades α y β en los anillos es desconocida. Sólo se han identificado homólogos de la proteína GroES en cloroplastos de cebada (Hartman y col., 1992a).

La RBSP muestra una ligera inducción en respuesta al choque térmico. La única evidencia a favor de la implicación de RBSP en la biogénesis del cloroplasto, independientemente del ensamblaje de rubisco, se reduce a la identificación de varios polipéptidos asociados a esta proteína tras su importación al cloroplasto (Lubben y col., 1989). Sin embargo, RBSP puede reemplazar a GroEL/ES en ensayos de reconstitución *in vitro* de Rubisco de *R.rubrum* (Goloubinoff y col., 1989a), así como las proteínas GroE pueden promover la formación de oligómeros activos de rubisco cuando los genes de GroEL y GroES y de las subunidades grandes y pequeñas de Rubisco de *A.nidulans* son coexpresadas en *E.coli* (Goloubinoff y col., 1989b). Estos hallazgos evidencian la existencia de una homología funcional importante entre ambas chaperoninas, hecho no sorprendente si tenemos en cuenta que GroEL de *E.coli* y RBSP de *T.aestivum* presentan una identidad aminoacídica del 46%.

Chaperoninas mitocondriales.

El análogo mitocondrial de GroEL (hsp60) fue identificado inicialmente por McMullin y Hallberg (1987) en la mitocondria de *Tetrahymena thermophila*. Estos mismos autores demostraron posteriormente la presencia de análogos inmunológicamente relacionados con esta proteína en la mitocondria de otras especies (McMullin y Hallberg, 1988). El clonaje y secuenciación del gen de hsp60 de *S.cerevisiae* (Reading y col., 1989; Johnson y col., 1989) mostró la existencia de un 54% y un 45% de identidad aminoacídica con GroEL y la subunidad α de RBSP (Hemmingsen y col., 1988), respectivamente. La posterior disponibilidad de clones de esta proteína de otros organismos (Jindal y col., 1989; Picketts y col., 1989; Peralta y col., 1990) ha confirmado la existencia de un grado de conservación semejante (identidad próxima al 60% entre las hsp60 de 2 especies cualesquiera). Hsp60 se expresa constitutivamente aunque se induce de 2 a 3 veces en respuesta a choque térmico (Cheng et al., 1989).

La hsp60 nativa se encuentra en la matriz mitocondrial en forma de homodecatetramero constituido por 2 anillos con simetría radial de orden 7 y con un coeficiente de sedimentación de 20S (McMullin y Hallberg, 1988; Hutchinson y col., 1989). La chaperonina mitocondrial de células de mamíferos aparece en forma de un único anillo heptamérico (Viitanen y col., 1992). El análogo mitocondrial de GroES se ha identificado en células de hígado bovino y de rata (Lubben y col., 1990), de hepatoma (Hartmann y col. 1992b) y en semillas de cebada (Hartmann y col., 1992a) como una proteína de 9, 10 y 12 kDa, respectivamente. En células de mamíferos, cpn10 se encuentra en forma nativa como un oligómero de 65 kDa (Hartmann y col., 1992b) o 45

kDa (Lubben, 1990), lo que sugiere una disposición homoheptamérica semejante a la descrita para GroES.

Hsp60 es una proteína esencial para la viabilidad celular en levaduras, ya que la inactivación de su gen resulta letal a cualquier temperatura (Reading y Hallberg, 1989). Las primeras evidencias sobre el papel funcional de hsp60 en la mitocondria fueron obtenidas mediante el estudio de una cepa mutante (*mif4*) que expresa una forma termosensible de hsp60 (Cheng y col., 1989). Estas células son incapaces, a la temperatura restrictiva, de ensamblar los complejos macromoleculares mitocondriales, a pesar de que las subunidades aisladas son correctamente translocadas y procesadas. Esta alteración se ha demostrado tanto para los polipéptidos dirigidos hacia la matriz mitocondrial (ornitina transcarbamilasa y F1-ATPasa (Cheng y col., 1989); y la propia hsp60 (Cheng y col., 1990)) como para aquellos dirigidos al espacio intermembrana (proteína Fe-S de Rieske y citocromo b2) (Cheng y col., 1989), que son incapaces de alcanzar su destino submitocondrial final.

Por otro lado, se ha demostrado la implicación directa de hsp60 en el plegamiento de proteínas en la matriz mitocondrial (Ostermann y col., 1989). Se ha encontrado que en mitocondrias carentes de ATP en la matriz, tratadas con NEM o incubadas a baja temperatura, existe una asociación física entre hsp60 y distintos precursores desplegados. La adición de ATP revierte esta asociación a la vez que permite la liberación del precursor en una forma parcialmente plegada (Ostermann y col., 1989). Por otro lado, la asociación entre hsp60 y precursores mitocondriales no parece ser exclusiva de aquellos polipéptidos codificados por el genoma nuclear, puesto que también se ha observado que ciertos polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial cosedimentan y coinmunoprecipitan con hsp60 (Prasad y col., 1990; Hallberg, 1990). En eucariotas superiores, las únicas evidencias con respecto al papel funcional de cpn60 lo constituyen la demostración de la capacidad de los oligómeros de hsp60 de promover el plegamiento de Rubisco *in vitro* (Viitanen y col., 1992b) y la interacción de hsp60 con el producto del oncogen ras (Ikawa y Wember, 1992) y la identificación de interacciones transitorias entre el análogo de hsp60 de células de mamíferos (hsp58) (Mizzen y col., 1989) y precursores mitocondriales recién sintetizados (Mizzen y col., 1991).

La expresión del gen de hsp60 de levadura está regulada en respuesta a una gran variedad de condiciones físicas y metabólicas. Así, hsp60 se induce 4-5 veces cuando las células son transferidas a un medio con glicerol o etanol como única fuente de carbono. El homólogo de hsp60 en la mitocondria de maíz muestra una expresión 3 veces superior en embriones que en tejidos adultos (Prasad y Hallberg, 1989). En eucariotas superiores se

han identificado 6 pseudogenes de hsp60 y un único gen carente de intrones (Venner y col., 1990).

Chaperoninas citosólicas.

La identificación en el citosol de células eucariotas de moléculas semejantes a cpn60 sugiere la existencia en este compartimento de una maquinaria proteica responsable del plegamiento y ensamblaje de polipéptidos semejante a la presente en bacterias, cloroplastos y mitocondrias.

La primera evidencia en este sentido fue proporcionada por Gupta (1990) al identificar ciertas homologías de secuencia entre distintas cpn60s y la proteína TCP1 (Tailless Complex Polypeptide 1) de distintos organismos. Esta proteína se ha visto implicada en defectos del desarrollo embrionario y en la maduración estructural y funcional del espermatozoide (Silver y col., 1979). La confirmación definitiva al respecto fue proporcionada por Trent y col. (1991) al identificar la proteína de heat-shock más abundante en el citosol de la arqueobacteria *Sulfolobus shibatae* (TF55) como un chaperon molecular con actividad ATPasa, capaz de interaccionar con polipéptidos desnaturalizados y que presenta una gran similitud de secuencia con TCP-1. TF55 se encuentra en forma de oligómeros resultantes de la asociación de 2 anillos toroidales de 8 ó 9 monómeros cada uno.

En células eucariotas, se ha demostrado que TCP-1 se encuentra en el citosol como un complejo heteromérico de 800-950 kDa (Lewis y col., 1992) y que interacciona con la molécula de β -tubulina promoviendo la adquisición por parte de ésta de una conformación resistente a proteasas y competente para su ensamblaje (Yaffe y col., 1992), lo que parece explicar el importante papel de TCP-1 en la biogénesis de la tubulina *in vivo* (Ursic y Culbertson, 1991). Por otro lado, se ha purificado de reticulocitos de conejo un complejo de 800 kDa capaz de catalizar el plegamiento ATP-dependiente de la molécula de β -actina (Gao y col., 1992) y constituido por 7 polipéptidos de 55-68 kDa, uno de los cuales es inmunoreactivo frente a un anticuerpo contra TCP-1. Este complejo parece ser el mismo que el identificado por Yaffe y col. (1992). En testículo bovino, TCP-1 aparece como un anillo hetero-oligomérico de 970 kDa (TRiC) que es capaz de promover el plegamiento ATP-dependiente de luciferasa y tubulina en ausencia de ningún otro factor proteico (Frydman y col., 1992).

1.2.2.2. *Mecanismo de acción de las chaperoninas.*

La mayor parte de los conocimientos actuales disponibles acerca del mecanismo de acción de las chaperoninas a nivel molecular se ha obtenido mediante el desarrollo de sistemas de plegamiento y/o ensamblaje *in vitro* con GroEL/S purificadas y polipéptidos sustrato artificialmente desnaturalizados, en los que las transiciones estructurales del polipéptido sustrato son monitorizadas mediante determinación de la variación en la fluorescencia intrínseca, o indirecta asociada a una sonda fluorescente, de la sensibilidad a proteasas o de la actividad enzimática.

El número de proteínas para las que se ha descrito recuperación con éxito de su estructura nativa y actividad enzimática tras su desnaturalización artificial e incubación con GroEL y GroES ha crecido enormemente en los últimos años. Hasta la fecha, se ha demostrado renaturalización mediada por GroE en: Rubisco dimérico de origen procariota (Goloubinoff y col., 1989a; Viitanen y col., 1990), citrato sintasa (Buchner y col., 1991; Zhi y col., 1992), rodanasa (Martin y col., 1991; Mendoza y col., 1991), dihidrofolato reductasa (Martin y col., 1991; Viitanen y col., 1991), triptofanasa (Mizobata y col., 1992), glutamina sintetasa (Fisher y col., 1992), β -lactamasa (Laminet y col., 1990), distintos enzimas termofílicos (Taguchi y col., 1991), 6-hidroxi-D-nicotina oxidasa (Brandsch et al., 1992) y el propio GroEL (Lissin et al., 1990). Por otro lado, se ha comprobado que GroEL forma complejos estables con aproximadamente la mitad de las proteínas solubles en estado desnaturalizado de *E.coli* (Viitanen y col., 1992a). Además, se ha comprobado que el rendimiento en la producción de polipéptidos heterólogos recombinantes activos en cepas de *E.coli* genéticamente manipuladas es muy superior cuando en estas mismas cepas existe co-sobreexpresión simultánea de distintos chaperones (Wynn y col., 1992; Lee y Olins, 1992, Goloubinoff y col., 1989b).

Todos estos estudios indican que la capacidad de GroEL/S de promover el plegamiento y ensamblaje de distintos polipéptidos artificialmente desplegados de muy distinto origen. Sin embargo, no existen evidencias concluyentes que demuestren la capacidad de GroEL de replegar agregados proteicos. La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el plegamiento de polipéptidos mediado por chaperoninas requiere (i) definir la conformación en la que el sustrato polipéptidico se encuentra asociado a GroEL y (ii) caracterizar los distintos intermedios de reacción que aparecen durante el proceso de plegamiento.

El análisis de la fluorescencia intrínseca de distintos polipéptidos unidos a GroEL de forma estable muestra que los sustratos presentan una conformación intermedia entre el

estado nativo y la conformación absolutamente desplegada. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que los polipéptidos unidos a GroEL presentaban una conformación semejante a la denominada "molten globule". Este tipo de estado conformacional fue identificado inicialmente como un intermedio cinético tanto del proceso de desnaturalización con agentes suaves como durante la renaturalización de distintos polipéptidos (ver revisiones de Creighton, 1990 y Van der Goot y col., 1992). El estado "molten globule" se caracteriza por (i) presentar un contenido en elementos de estructura secundaria semejantes al de la conformación nativa, (ii) contener algunos residuos inaccesibles al solvente, (iii) presentar una elevada flexibilidad en las cadenas laterales, (iv) poseer una compactación próxima a la del estado nativo y (v) no mostrar transición térmica tras el calentamiento.

La naturaleza de los elementos estructurales del sustrato que son reconocidos por GroEL es desconocida. Se ha demostrado que GroEL puede interaccionar con el péptido c de la glicoproteína del VSV (virus de la estomatitis vesicular) (Landry y col., 1992) y con un fragmento proteico correspondiente a una α -hélice de la región amino terminal de la rodanasa nativa (Landry y Gierasch, 1991b), y que en ambos casos, el péptido adquiere una conformación de α -hélice al unirse a GroEL, según se demuestra mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (Landry y col., 1992; Landry y Gierash, 1991b). Además, un examen detallado de las estructuras terciarias de proteínas cuyo plegamiento/ensamblaje es catalizado por GroEL muestra que todas ellas contienen α -hélices expuestas al solvente (Landry y Gierasch, 1991a). Sin embargo, se ha demostrado unión a y renaturalización catalizada por GroEL de un fragmento Fab de una inmunoglobulina, que carece por completo de estructura secundaria de α -hélice (Schmidt y Buchner, 1992). El hecho de que GroEL parezca reconocer regiones con estructura secundaria definida en sus sustratos polipéptidicos constituye un hecho diferencial con respecto a hsp70, que aparentemente interacciona con regiones polipéptidicas desplegadas (Landry y col., 1992).

Aunque la estructura cuaternaria del oligómero de hsp60 presente una simetría radial de orden 7, no se ha demostrado interacción simultánea de más de 1 ó 2 polipéptidos por cada molécula de GroEL (Lecker y col., 1989; Laminet y col., 1990; Martin y col., 1991). Esta estequiometría parece indicar que los protómeros de GroEL dan lugar a la formación de un único sitio activo localizado en el centro de la molécula o bien que aún existiendo 14 sitios activos, la interacción simultánea de un número elevado de sustratos se vea limitada por impedimento estérico (Hendrix, 1979). En este último caso, un polipéptido parcialmente plegado podría interaccionar con el oligómero a través de varias regiones expuestas. GroEL es capaz de unir hasta 14 moléculas de ATP

(Bockhareva y col., 1992), cuya hidrólisis se produce siguiendo una cinética de cooperatividad positiva (Bockhareva y col., 1992).

La transición estructural desde un intermedio en el estado de "molten globule" asociado a GroEL hasta una molécula funcional requiere de la intervención de GroES y ATP. En ausencia de GroES, la hidrólisis de ATP por GroEL conduce a la liberación del sustrato que puede sufrir una renaturalización espontánea (p.ej. dihidrofolato reductasa)(Martin y col., 1991) o bien una agregación irreversible (p.ej. rodanasa)(Martin y col., 1991). Sin embargo, cuando GroES se encuentra presente, la actividad ATPasa de GroEL aparece fuertemente modulada, de forma que se produce una liberación gradual del sustrato (Martin y col., 1991), que conduce finalmente a la renaturalización del mismo. Se han descrito ensayos de plegamiento *in vitro* en los que GroEL es funcionalmente reemplazable por hsp60 de mitocondrias de levadura (Goloubinoff y col., 1989a) o de mamíferos (Viitanen y col., 1992a) o por RBSP (Goloubinoff y col., 1989a). La proteína GroEL se fosforila reversiblemente durante el choque térmico lo que origina un cambio en sus propiedades que resulta en que la liberación ATP-dependiente del sustrato ocurre en ausencia de GroES (Sherman y Goldberg, 1992)

1.2.3. Proteínas de estrés de 70 kDa.

Esta familia comprende un amplio grupo de proteínas localizadas tanto en organismos procariotas como en distintos compartimentos de células eucariotas. Los estudios iniciales sobre estas proteínas proporcionaron las primeras evidencias sobre el posible papel de las proteínas de estrés en la recuperación de las alteraciones morfológicas inducidas en la célula por el tratamiento de estrés.

Las características generales de esta familia de proteínas se pueden resumir en:

- 1.-Se expresan de forma constitutiva.
- 2.-Alta similitud de secuencia entre los distintos miembros de la familia (50% de identidad aminoacídica), siendo la semejanza superior en los 2/3 N-terminales que en el resto de la proteína.
- 3.-Todas son capaces de unir y/o hidrolizar ATP, estando esta actividad regulada por otros factores proteícos.

4.-Aunque presentan una inducción diferencial en respuesta a distintos tipos de estrés, todas ellas son inducidas en última instancia como resultado del acúmulo intracelular de proteínas desnaturalizadas.

5.-Requieren de otras proteínas de estrés para desempeñar su función.

1.2.3.1 Clasificación de las proteínas de estrés de 70 kDa

Proteínas de estrés de 70 kDa en procariotes (DnaK).

Fue identificada inicialmente como el producto de un gen necesario para la replicación del fago λ (Friedman y col., 1984), aunque su función resulta esencial para la viabilidad celular (Georgopoulos, 1989). Las mutaciones en el gen que codifica para DnaK se manifiestan de forma pleiotrópica, dando lugar a cepas termosensibles que presentan alteraciones severas en la síntesis de DNA y RNA, defectos en las rutas proteolíticas y sobreexpresión de otras proteínas de estrés incluso a temperaturas no restrictivas.

Se han descrito las siguientes funciones para DnaK:

- Mantener precursores proteicos en una conformación competente para la translocación e impedir su agregación. Se ha demostrado que DnaK es capaz de unirse a proteínas eucariotas cuando éstas se sobreexpresan en *E.coli* (Clarke y col., 1988). Además, la sobreexpresión de DnaK permite detectar asociaciones transitorias entre este polipéptido y proteínas de fusión con lacZ (Philips y Silhavy, 1990), facilitando la exportación de estos productos. En general, la función de mantener los precursores en una conformación competente para la translocación a través de membranas parece ser desempeñada fundamentalmente por otro chaperon, SecB, de forma colateral por "trigger factor" y GroEL (Lecker y col., 1989), y sólo excepcionalmente por DnaK (Philips y Silhavy, 1990).

- Inicio de la replicación del DNA del bacteriofago λ durante el ciclo lítico de infección. En este caso, DnaK coopera con otras 2 proteínas de estrés de *E.coli*, DnaJ y GrpE, en la liberación de la proteína P del fago λ del complejo preprimosomal inactivo para así facilitar la acción desenrolladora de DnaB (Georgopoulos, 1990). DnaK también coopera con DnaJ para activar la proteína iniciadora RepA y permitir su unión al origen de replicación del plásmido P1 (Wickner y col., 1991).

- Renaturalización de proteínas inactivadas por choque térmico. DnaK es capaz de reactivar de forma ATP-dependiente la RNA polimerasa de *E.coli* desnaturalizada previamente por tratamiento hipertérmico (Skowrya y col., 1990). Se ha comprobado también que la renaturalización *in vivo* de la proteína represora λ ci857 requiere de la presencia de DnaK, DnaJ y GrpE funcionales (Gaitinaris y col., 1990).

- Autoregulación de la respuesta a choque térmico. DnaK ha sido calificada como el "termómetro celular" (Craig y Boss, 1991) dada su capacidad de regular la disponibilidad de σ^{32} , la subunidad que confiere a la RNA polimerasa la especificidad para la transcripción de los genes que constituyen el regulon heat-shock, en función del contenido intracelular en proteína desnaturalizada. En condiciones basales, un alto porcentaje del total celular de σ^{32} se encuentra asociado a DnaK (Liberek y col., 1992), estando por tanto bloqueada la transcripción a partir de promotores dependientes de σ^{32} (Straus y col., 1990). Tras el choque térmico, DnaK es movilizada y pasa a unirse a los sustratos por los que presenta mayor actividad (superficies interactivas en proteínas desnaturalizadas), liberándose entonces σ^{32} con la consiguiente activación de la transcripción de genes heat-shock (Straus y col., 1990). Estudios recientes han demostrado la existencia de complejos bien diferenciados entre σ^{32} con DnaK y GrpE y de σ^{32} con DnaJ, lo que sugiere que la activa transcripción mediada por σ^{32} puede ser regulada diferencialmente por DnaJ y DnaK/GrpE (Gamer et al., 1992).

DnaK presenta una baja actividad ATPasa (1 molécula hidrolizada por cada 5 minutos) pero que puede ser estimulada hasta 50 veces por DnaJ (incrementa la hidrólisis del nucleótido) y por GrpE (acelera el recambio de los nucleótidos unidos) (Gething y Sambrook, 1992; Ang y col., 1991). Esta regulación de la actividad ATPasa parece ser necesaria para explicar la intervención de DnaJ y GrpE en la liberación de sustratos unidos a DnaK y facilitar así el reciclaje de DnaK hacia nuevos sustratos.

DnaK es capaz de autofosforilarse *in vitro* tras incubación con ATP (Zylicz y col., 1983). La actividad ATPasa y la capacidad de autofosforilación de DnaK son estimuladas por iones Ca^{2+} (Cegielska y Georgopoulos, 1989).

Proteínas de estrés de 70 kDa citosólicas.

Este subgrupo comprende a los productos de los 4 genes Ssa (stress seventy) (Ssa1, Ssa2, Ssa3 y Ssa4) y los 2 genes Ssb (Ssb1 y Ssb2) en levaduras y la forma inducible (hsp72) y constitutiva (hsp73=hsc70) de la hsp70 en eucariotas superiores.

Las funciones descritas para este grupo de proteínas son:

- Translocación de proteínas a través de membranas. En levaduras, la importación de proteínas a la mitocondria y al retículo endoplásmico tanto *in vitro* como *in vivo* requiere de la presencia de hsp70s citosólicas (Deshaies y col., 1988; Chirico y col., 1988; Murakami y col., 1988), así como de otros cofactores. Un papel semejante se ha propuesto para la hsp70 de células eucariotas superiores (Zimmerman y col., 1988). Además, las proteínas de estrés de 70 kDa citosólicas se han visto implicadas en el transporte de proteínas al núcleo (Imamoto y col., 1992; Shi y Thomas, 1992) y al cloroplasto (Waegeman y col., 1990). Dado que este requerimiento (al menos en el caso de precursores mitocondriales) puede ser obviado cuando los precursores son previamente desnaturalizados con urea (Chirico y col., 1988; Murakami y col., 1988), las hsp70 parecen actuar promoviendo un relajamiento ATP-dependiente en la estructura terciaria del precursor o disolviendo agregados de precursores no translocados. *In vivo*, se ha observado la existencia de interacciones entre hsp70 y polipéptidos citosólicos recién sintetizados. Esta interacción puede ser revertida en células normales tras adición de ATP, mientras que en células sometidas a distintos tipos de estrés, las interacciones son irreversibles (Beckmann y col., 1990).

- Recuperación de las alteraciones producidas en la morfología nucleolar provocadas por choque térmico. Los estudios iniciales demostraron que el tratamiento hipertérmico en distintos sistemas experimentales provocaban una translocación de la hsp70 desde el citosol hacia el núcleo, estando allí asociada al nucleolo (Arrigo y col., 1980; Velázquez y col., 1980; Velázquez y Lindquist, 1984), uno de los orgánulos cuya morfología se ve más alterada durante el choque térmico (ver 1.1.2.1). La evidencia concluyente sobre el papel protector de la hsp70 en el nucleolo fue proporcionada por Pelham (1984) al comprobar que la recuperación de la morfología nucleolar era mucho más rápida en células que expresaban altos niveles de hsp70 que en las controles.

- Despolimerización de las cubiertas de clatrina. La proteína responsable del desensamblaje de las cubiertas de clatrina mediante desplazamiento de los triskeliones fue identificada por Rothman y Schmid (1986) como una ATPasa que posteriormente demostró ser idéntica a la hsp70 citosólica de expresión constitutiva (hsc70 o hsp73) (Ungewickell, 1985; Chappel y col., 1986). El mecanismo que permite la eliminación selectiva de los monómeros de clatrina en las vesículas endocíticas implica cambios en las concentraciones de Ca^{2+} y K^{+} en las proximidades de la vesícula, lo que provoca un cambio conformacional en la cadena ligera de clatrina que expone un sitio de unión a hsc70 (DeLuca-Flaherty, 1990).

- Degradación lisosomal de proteínas intracelulares. Prp73, una proteína probablemente idéntica a hsp73, es capaz de interactuar con ciertas regiones peptídicas cuya función es la de dirigir al polipéptido que las contiene hacia la degradación lisosomal cuando se retira el suero del medio de cultivo (Chiang y col., 1989). La reconstitución *in vitro* del sistema de degradación muestra que prp73 ejerce su función de forma ATP-dependiente (Chiang y col., 1989).

- Los productos de los genes Ssb1 y Ssb2 interactúan con ribosomas activos, asociación que puede ser revertida por puromicina, por lo que se ha sugerido la implicación de Ssb1/2p en el paso de polipéptido nascente a través del ribosoma (Nelson y col., 1992).

La reciente identificación de homólogos de la proteína DnaJ en el citosol de células eucariotas (YDJ1, SIS1) (Caplan y Douglas, 1991; Atencio y Yaffe, 1992; Luke y col., 1991) sugiere la existencia de interacciones funcionales entre éstos y hsp70. De hecho, la afinidad de Ssa1p por un sustrato artificial está fuertemente modulado por YDJ1p (Cyr y col., 1992) y la importación de proteínas a la mitocondria aparece fuertemente alterada en mutantes termosensibles de YDJ1 (Atencio y Yaffe, 1992).

Proteínas de estrés de 70 kDa en el retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico de células eucariotas contiene en su lumen una proteína de 78 kDa que fue descrita inicialmente como proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina (BiP) (Haas y Wabl, 1983; Morrison y Scharf, 1975) y como "glucose regulated protein" (grp78) Pouyssegur y col., 1977). En levaduras, esta proteína resulta de la expresión del gen Kar2, un gen implicado en la fusión nuclear tras la conjugación de 2 células (Rose y col., 1989).

Las funciones descritas hasta la fecha para BiP son las siguientes:

- BiP está implicada en la retención de proteínas en el retículo endoplásmico. Todos los polipéptidos que acceden a la vía exocítica deben adquirir su estructura nativa en el retículo endoplásmico para poder ser eficientemente secretados (Rose y Doms, 1988). Se ha demostrado que BiP interactúa en el lumen del retículo con polipéptidos que presentan una estructura no nativa, tanto en aquellos casos cuyo plegamiento se ve impedido por una glicosilación aberrante (Dorner y col., 1987; Hurtley y col., 1989; Kassenbrock y col., 1988; Accili y col., 1992), como en aquellas proteínas oligoméricas

cuyos polipéptidos integrantes se encuentran aún en estado monomérico, como ocurre en el caso de la cadena pesada de IgG (Bole y col., 1986; Haas y Wabl, 1983) o con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (Hurtley y Helenius, 1989). Sin embargo, mientras que BiP interacciona con los monómeros no ensamblados de proteínas oligoméricas de forma transitoria, los polipéptidos con glicosilación alterada se mantiene unidos a BiP de forma estable, por lo que probablemente nunca accederán a la vía exocítica, ya que serán degradados directamente en el retículo endoplásmico.

- BiP parece intervenir de forma directa o indirecta en la translocación de precursores a través de la membrana del retículo endoplásmico. Evidencias en este sentido provienen de la identificación de precursores de la vía secretora en el citosol en mutantes de levadura para el gen Kar2 (Vogel y col., 1990; Nguyen y col., 1991). Por otro lado, el producto del gen SEC63, una proteína transmembrana del retículo, requerida para la translocación de precursores de la vía secretora (Rothblatt y col., 1989), contiene un dominio intraluminal con homología de secuencia con DnaJ, por lo que es posible que exista una interacción entre BiP y Sec63p de forma semejante a lo que ocurre en *E.coli* entre DnaK y DnaJ para distintos procesos (ver 1.2.3.1).

Proteínas de estrés de 70 kDa en la mitocondria.

Se han identificado proteínas de estrés de 70 kDa en la mitocondria de distintos organismos (Leustek y col., 1989; Engman y col., 1989; Craig y col., 1989; Mizzen y col., 1989). En *S.cerevisiae*, esta proteína proviene de la expresión del gen SSC1 (Craig, 1989), gen que resulta esencial para la viabilidad celular (Craig y col., 1987). En células de mamíferos, se ha identificado una proteína mitocondrial de 75 kDa que se induce en respuesta a deficiencia de glucosa (grp75) (Mizzen y col., 1989). La proteína Ssc1p de levadura presenta una alta similitud de secuencia con DnaK, lo que apoya la hipótesis de un origen endosimbionte de la mitocondria. Se ha identificado un análogo de DnaJ en la mitocondria de levadura (SCJ1), pero su función permanece desconocida (Blumberg y Silver, 1991).

La hsp70 mitocondrial es necesaria para la translocación de precursores a través de la membrana interna mitocondrial (Kang y col., 1990), como parecen indicar (i) las interacciones transitorias observadas entre hsp70 y distintos precursores mitocondriales en mutantes del gen SSC1 (Kang y col., 1990; Ostermann y col., 1990) o en mitocondrias aisladas y deenergizadas (Scherer y col., 1990) y (ii) la detección mediante cross-linking de complejos conteniendo hsp70, ISP42 y precursores parcialmente translocados (Scherer y col., 1990)). La interacción entre hsp70 y precursores mitocondriales requiere

de la hidrólisis de ATP para su finalización, y precede a la posterior asociación de los precursores con hsp60 (Manning-Krieg y col., 1991).

Proteínas de estrés de 70 kDa en el cloroplasto.

Se han identificado recientemente proteínas de estrés de 70 kDa en el estroma del cloroplasto de distintos organismos (Amir-Shapira, 1990; Marshall, 1990). Esta proteína resulta ser esencial para la integración del precursor del LHC (light harvesting complex) en la membrana del tilacoide (Yalovsky y col., 1992).

Una ilustración esquemática de las funciones de las hsp70 en células eucariotas se muestra en la figura 1.1.

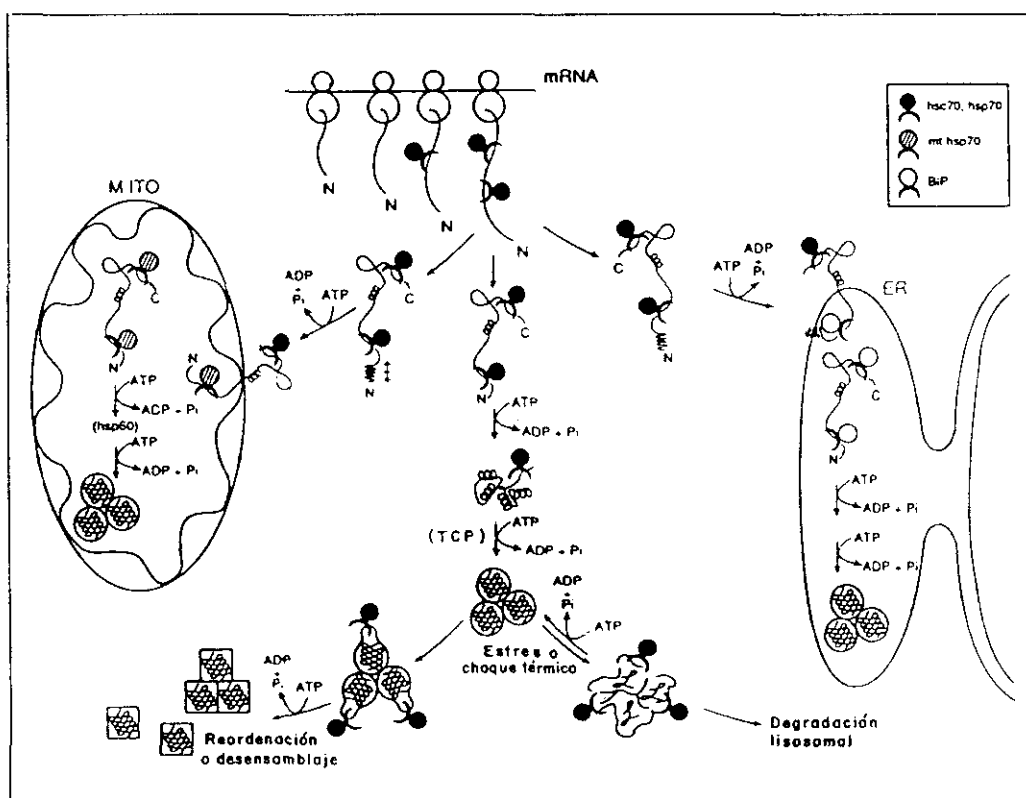


Figura 1.1. Ilustración esquemática de las funciones de las proteínas de estrés de 70 kDa en células eucariotas. En la figura se muestra el papel funcional de las proteínas de estrés de 70 kDa en los procesos de plegamiento y translocación de polipéptidos nacientes a través de membranas, reasociaciones moleculares, desensamblaje, protección frente al estrés y recambio proteico. Según Gething y Sambrook (1992).

1.2.3.2. Estructura de las hsp70s.

La comparación de secuencias de distintos miembros de la familia de las hsp70 muestran claramente (i) el alto grado de conservación existente, tanto entre distintos organismos como entre distintos compartimentos de una misma célula, (ii) la existencia de secuencias N- o C-terminales responsables del "targeting" o retención en distintos compartimentos celulares y (iii) la existencia de una mayor homología en la porción N-terminal (450 aminoácidos, 60% de la secuencia) que en el tercio C-terminal. El tratamiento con proteasas de la hsc70 de células de mamíferos (o clathrin uncoating ATPase) da lugar a un fragmento N-terminal de 44 kDa que conserva la actividad ATPasa pero desacoplada de la unión al sustrato (Chappell y col., 1987) y un fragmento C-terminal que parece estar implicado en la unión a los sustratos polipeptídicos.

Dicho fragmento N-terminal ha sido cristalizado y su estructura terciaria determinada hasta una resolución de 2.2 Å (Flaherty y col., 1990). Este dominio está formado por 2 lóbulos con una profunda hendidura central donde radica el sitio de unión del nucleótido. Esta disposición es muy semejante a la que aparece en 2 proteínas con actividad ATPasa, la hexoquinasa (Anderson y col., 1978) y la actina G (Kabasch y col. 1990).

La estructura terciaria de la porción C-terminal no ha sido determinada hasta el momento. Sin embargo, se han propuesto 2 modelos hipotéticos basados en que (i) la distribución de elementos de estructura secundaria es muy semejante a la que presentan los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MHC de clase I humano (Rippmann y col., 1991), (ii) dicha región presenta cierto grado de homología de secuencia con la proteína de MHC de clase I de *X.laavis* (Flajnik y col., 1991) y (iii) la predicción de estructura secundaria y los perfiles de hidrofobicidad son muy semejantes a los del MHC de clase I (Flajnik y col., 1991; Sadis y col., 1990). Estas semejanzas permitieron a 2 grupos el proponer un modelo de estructura terciaria para el fragmento C-terminal de la hsc70 basado en la estructura tridimensional del MHC de clase I humano (Bjorkmann y col., 1987). Según este modelo, el sitio de unión al péptido se localiza en una hendidura en la que aparecen tanto residuos hidrofóbicos como hidrofílicos. Si la estructura terciaria de ambas proteínas es realmente semejante, entonces el polipéptido sustrato de hsp70 debería unirse en una conformación extendida.

1.2.3.3. *Mecanismo de acción de las hsp70s.*

Aunque no se dispone de un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares implicados en la interacción hsp70-sustrato, los estudios realizados en los últimos años han proporcionado numerosas evidencias sobre 2 aspectos esenciales para entender la función de esta familia proteica: la interacción del sustrato polipeptídico y la actividad ATPasa acoplada a la liberación de dicho sustrato.

1.- Interacción con el sustrato: Las hsp70s no parecen reconocer secuencias consenso definidas en los sustratos polipeptídicos, sino que interaccionan con un amplio espectro de secuencias diana, lo que las permite participar en una gran variedad de procesos celulares. Los estudios de unión *in vitro* de BiP y hsc70 purificadas a oligopéptidos sintéticos de longitud variable indican que la afinidad de la interacción péptido-hsp70 podía oscilar hasta en 3 órdenes de magnitud entre los distintos péptidos (Flynn y col., 1989). Un estudio sistemático posterior demostró que hsp70 se unía preferentemente a oligopéptidos de 7 u 8 residuos, con preferencia por aquellos que presentan residuos de cadena lateral alifática en todas las posiciones, mientras que los residuos de prolina y con carga quedan excluidos (Flynn y col, 1991). Una excepción a este modelo parece ser la interacción de la proteína prp73 con los polipéptidos destinados a su degradación lisosomal. En este caso, la interacción de prp73 parece depender de una secuencia determinada en su sustrato polipeptídico.

El modelo propuesto por Pelham para explicar el mecanismo de acción de las hsp70 se basa en que la afinidad de las regiones hidrofóbicas del polipéptido por hsp70 es mayor que la de aquellas entre sí, permitiendo de esta forma que en aquellas condiciones fisiológicas (translocación a través de membranas, ensamblaje de monómeros) o patológicas (mutaciones, N-glicosilación alterada, estrés térmico) en las que existe una exposición transitoria al medio de regiones internas del polipéptido, la unión con hsp70 ocurra de forma preferencial con respecto a la agregación irreversible.

Las evidencias disponibles sugieren que las hsp70 interaccionan simultáneamente con distintas regiones de un mismo polipéptido, pero con acusadas diferencias en cuanto a su afinidad, de forma que algunas de estas interacciones no son lo suficientemente estables como para poder ser detectadas experimentalmente.

2.-Actividad ATPasa. Aunque la unión de las cadenas polipeptídicas desplegadas a hsp70 es independiente de ATP, su liberación requiere de la hidrólisis de ATP por hsp70 (Flynn y col., 1989; Flynn y col., 1991; Leustek y col., 1989; Munro y Pelham,

1986) y probablemente de la intervención de factores proteicos adicionales como DnaJ y GrpE, que estimula la actividad ATPasa de DnaK (Liberek y col., 1991). La hidrólisis de ATP, al menos en el caso de BiP, parece ser regulada por Ca^{2+} (Kassenbrock y Kelly, 1989). La unión de ATP a hsc70 favorece la conformación monomérica, mientras que la unión con ADP promueve la dimerización de la proteína (Schmid y col., 1985; Carlino y col., 1992). Dado que la afinidad de hsp70 por ADP es aproximadamente 6 veces mayor que por ATP, y que el complejo hsp70-ADP interacciona con mayor afinidad con polipéptidos desplegados que hsp70-ATP, se propuso que la liberación del sustrato polipeptídico requiere de un intercambio de ADP por ATP en el sitio de unión de nucleótido en hsp70, acompañado simultánea o posteriormente de la hidrólisis de ATP (Palleros y col., 1991). En efecto, los polipéptidos desplegados estimulan la actividad ATPasa de hsc70 mediante un aumento en la velocidad de recambio de ADP por ATP (Sadis y Hightower, 1992).

1.2.3.4. *Cooperación funcional entre las proteínas de estrés de 60 y 70 kDa en el plegamiento polipeptídico.*

Estudios *in vitro* con distintos chaperones moleculares purificados y polipéptidos artificialmente desplegados han permitido caracterizar los mecanismos moleculares que permiten a un polipéptido desplegado alcanzar una conformación funcional, mediante la interacción secuencial con distintos chaperones (Langer y col., 1992a). En esencia, el polipéptido desplegado es reconocido por DnaK, que coopera con DnaJ para mantener dicho polipéptido en un estado conformacional carente de estructura terciaria. Esta proteína es posteriormente transferida a GroEL/ES por medio de la interacción con GrpE y la hidrólisis de ATP. GroEL actúa catalíticamente en la generación de la conformación nativa. Estos estudios *in vitro* han llevado a proponer modelos hipotéticos para explicar el plegamiento proteico *in vivo* en el citosol bacteriano (Fig. 1.2A) y en la mitocondria (Fig. 1.2B). La existencia en la matriz mitocondrial de proteínas de estrés de 70 (Kang y col., 1990) y 60 kDa (Cheng y col., 1989), así como la presencia en dicho orgánulo de un homólogo de DnaJ (Blumberg y Silver, 1991) sugiere la existencia de una ruta semejante. De hecho, se ha comprobado que precursores proteicos mitocondriales interaccionan secuencialmente en la matriz de este orgánulo con hsp70 y hsp60 (Manning-Krieg, 1991) (Fig. 1.2B).

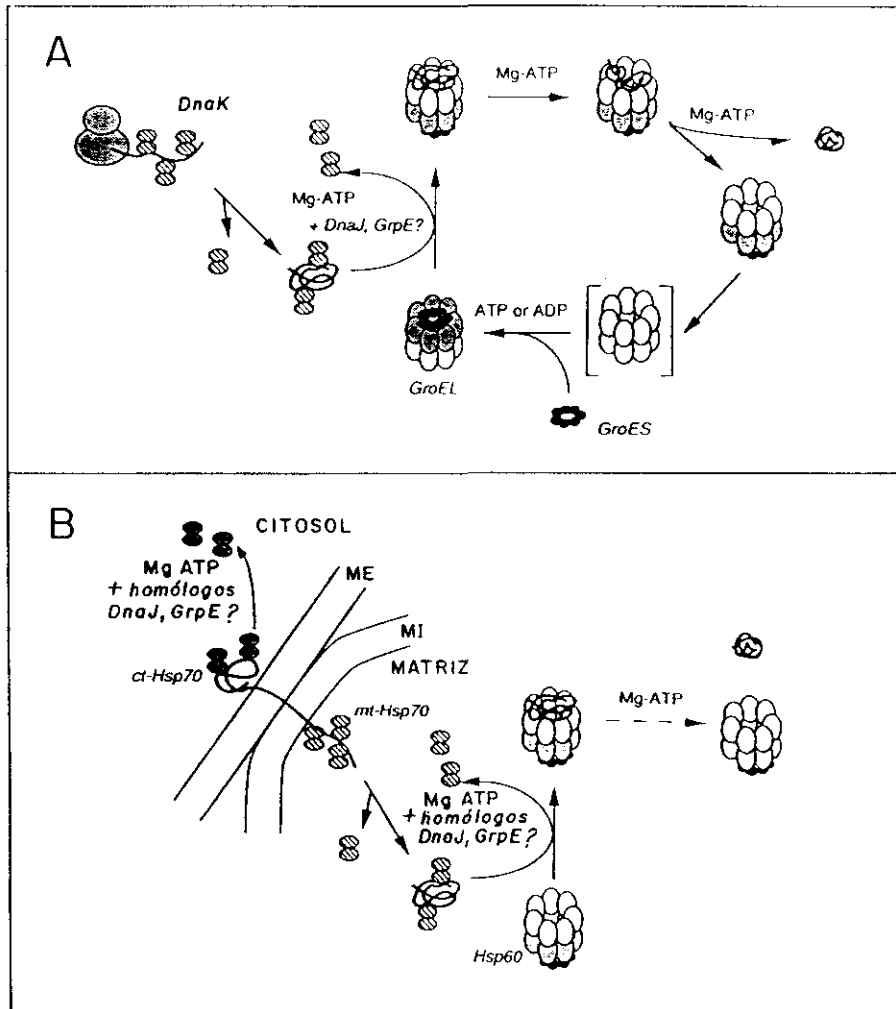


Figura 1.2 Modelo hipotético de la función secuencial de hsp70 y hsp60 en el plegamiento proteico *in vivo*.

(A) Plegamiento en el citosol bacteriano. En este caso, la interacción secuencial del polipéptido naciente con DnaK, GrpE/DnaJ y GroEL/ES y la hidrólisis a lo largo del proceso de 2 moléculas de ATP son necesarias para el plegamiento del polipéptido recién sintetizado. (B) Plegamiento en la matriz mitocondrial. Los precursores proteicos mitocondriales son mantenidos en una conformación desplegada competente para la translocación por medio de su interacción con las hsp70 citosólicas. Estos precursores interaccionan con la hsp70 mitocondrial tan pronto como comienzan a atravesar la membrana interna de este orgánulo. La liberación de hsp70 y la transferencia a hsp60 requiere de la hidrólisis de ATP, y muy probablemente, de la interacción con los homólogos mitocondriales de DnaJ y GrpE. El plegamiento hasta una conformación funcional se produce en la superficie de hsp60 con la intervención de hsp10 y requiere de ATP. Según Hartl y col. (1992).

1.2.4. Proteínas de estrés de 90 kDa.

Se han identificado proteínas de estrés de 87-92 kDa en todos los organismos estudiados hasta la fecha, aunque no aparecen de forma tan abundante como las hsp70. Se han identificado miembros de esta familia en *E.coli* (HtpG) (Bardwell y Craig, 1987), en *Drosophila* (hsp83) (Blackmann y Meselson, 1986), en *S.cerevisiae* (hsc83, de expresión constitutiva y hsp83, de muy baja expresión basal pero altamente inducible) (Lindquist y Craig, 1988). En células de vertebrados, existe al menos un representante citosólico (Welch, 1990) caracterizado por ser la proteína de estrés de mayor expresión constitutiva y un homólogo en el retículo endoplásmico denominado grp94 o endoplasmina (Pouyssegur y col., 1977; Lee y col., 1984; Mazzeella, 1987).

Las hsp90 citosólicas interaccionan *in vivo* con gran número de componentes celulares, incluyendo pp60src (el producto del oncogén src) (Brugge y col., 1981); y distintos polipéptidos resultantes de la expresión de oncogenes retrovirales (yes, fps, fgr, fes), la mayor parte de los cuales parecen tener actividad tirosina quinasa (Brugge, 1986). También se ha demostrado interacción de hsp90 con el factor eIF-2 α de la traducción (Rose y col., 1987) y con caseína quinasa II (Rose y col., 1987). Todas estas asociaciones parecen ser necesarias para mantener el sustrato en un estado inactivo. De especial interés resulta la asociación de hsp90 con el receptor de hormonas esteroideas (Catelli y col., 1985; Sánchez y col., 1985). El receptor recién sintetizado se asocia a hsp90 en una conformación parcialmente plegada (complejo 8S/9S) incapaz de activar la transcripción (Dalman y col., 1989). La unión de la hormona esteroidea promueve la disociación de hsp90 pasando el receptor a su forma transcripcionalmente activa (complejo 4S).

Hsp90 es capaz de promover la renaturalización *in vitro* de fragmentos Fab y de citrato sintasa de forma independiente de ATP (Wiech y col., 1992), aunque puede unir ATP de forma catión dependiente y sufrir autofosforilación (Csrmely y Kohn, 1991).

1.2.5. Otros chaperones moleculares.

SecB y *SRP*.

SecB facilita la secreción de proteínas en *E.coli* a través de un doble mecanismo. Por un lado, mantiene el precursor en una conformación desplegada competente para su translocación (Kumamoto, 1991) y por otro lado, permite el "targeting" del precursor a la membrana plasmática mediante su interacción específica y de alta afinidad con SecA, otro componente de la maquinaria de translocación que acopla la hidrólisis de ATP a la

translocación del precursor a través de la membrana cooperando con el complejo SecY/E (Hartl y col., 1990a). SecB es un oligómero formado por 4 subunidades idénticas de 16 kDa (Watanabe y Blobel, 1989), por lo que presenta múltiples sitios de unión al sustrato. Cuando todos los sitios de unión a sustrato se encuentran ocupados, el complejo sufre un cambio conformacional que provoca la exposición al medio de una región altamente hidrofóbica (Randall, 1992).

En células eucariotas existe una maquinaria análoga responsable del "targeting" de proteínas de la vía secretora hacia el retículo endoplásmico. Los componentes moleculares de este sistema incluyen la SRP (signal recognition particle), proteína que se une a la presecuencia de los precursores de la vía exocítica de forma cotraduccional bloqueando reversiblemente la elongación (Walter y Blobel, 1981) y su receptor en la membrana del retículo, la "docking protein" (Connolly y Gilmore, 1989), que permite el reinicio de la elongación y la translocación del precursor a través de la membrana del retículo. El resto de componentes implicados en la translocación del precursor a través de la membrana del retículo en eucariotes son aún vagamente conocidos (Rapoport, 1991). Se ha descrito la existencia de un complejo ribonucleoproteico en *E.coli* semejante a la SRP (Ribes y col., 1989), cuya función permanece desconocida.

Trigger factor.

"Trigger factor" es una proteína muy abundante en citosol de *E.coli* cuya función parecer ser la de estabilizar precursores para su translocación a través de la membrana (Crooke y Wickner, 1987; Lecker y col., 1989), de forma semejante a como funciona GroEL (Guthrie y Wickner, 1990). Sin embargo, aunque se ha demostrado una interacción directa entre "trigger factor" y el precursor proOmpA *in vivo*, ésta resulta en una inhibición de la secreción de dicho precursor (Guthrie y Wickner, 1990). Por tanto parece ser que el único factor citosólico implicado en la exportación de precursores de *E.coli* es SecB, a pesar de la mayor abundancia de "trigger factor" y GroEL. El fundamento bioquímico de este hecho radica en que SecB puede dirigir el precursor hacia la membrana gracias a su afinidad por SecA, mientras que los otros chaperones son incapaces.

Presequence binding factors.

Su existencia fue sugerida inicialmente cuando se observó que el transporte de precursores aislados a mitocondria y a microsomas requería de la presencia de factores citosólicos (Argan y col., 1983; Miura y col., 1983; Ohta y Schatz, 1984; Randall y

Shore, 1989). Dos de estas proteínas se han purificado a partir de lisados de reticulocitos de conejo. Una de ellas aparece como un oligómero de 5.5S compuesto por unidades de 50 kDa que es capaz de unirse a la presecuencia del precursor mitocondrial de la OTC, impidiendo su plegamiento prematuro y agregación y facilitando su transporte al interior de la mitocondria (Murakami y Mori, 1990; Murakami y col., 1990). Esta proteína se denomina PBF (presequence binding factor) y es necesaria para la importación de algunos (aspartato amino transferasa, ornitina transcarbamilasa, malato deshidrogenasa) pero no de todos los precursores mitocondriales (tiolasa) (Murakami y col., 1992). Otra proteína citosólica de 28 kDa también parece ejercer una función semejante ya que anticuerpos contra ella bloquean la importación de algunos precursores mitocondriales (Ono y Tuboi, 1990).

Nucleoplasmina.

Fue inicialmente descrita por Laskey y col., (1978). La nucleoplasmina es una proteína ácida, termoestable, altamente fosforilada y pentamérica (Earnshaw y col., 1980) cuyas funciones parecen ser: (i) intervenir en el ensamblaje de los nucleosomas (Dilworth y Dingwall, 1988) y (ii) estabilizar el "pool" intracelular de histonas que aparecen en determinadas etapas del desarrollo (Woodland y Adamson, 1977).

PapD

PapD es una proteína presente en el espacio periplásmico de las cepas patógenas de *E.coli* capaces de producir nefritis. Estas cepas se caracterizan por presentar unos pili especiales denominados P que permiten a la bacteria adherirse a residuos de digalactósido presentes en la superficie de las células que recubren el tracto urinario (Norgren y col., 1984). Los pili se forman a partir de ensamblajes macromoleculares (1000 subunidades) de 4 proteínas estructurales (PapA, PapE, PapF y PapG) (Lindberg y col., 1987). Todas estas proteínas son codificadas en un único operón que además, contiene información para 2 proteínas adicionales, PapC que forma un canal en la membrana externa de la bacteria y PapD que forma complejos con al menos 2 proteínas estructurales (PapG y PapE) antes de su ensamblaje definitivo en el pilus y que parece ser necesaria para asegurar el plegamiento y ensamblaje post-traducciona l de los componentes del pilus (Hultgren y col., 1989).

PapD es un chaperon atípico en el sentido de que no requiere ATP para su función, es de menor tamaño que el resto de chaperones conocidos y desempeña funciones muy concretas. La estructura terciaria contiene 2 dominios globulares formados

cada uno de ellos por β -láminas antiparalelas. Ambos dominios delimitan una región hidrofóbica flanqueada por residuos ácidos y básicos (Holmgren y Brandon, 1989). Cada dominio muestra una topología semejante a la fracción constante de la molécula de inmunoglobulina G. Estudios de mutagénesis dirigida indican que la región interglobular contiene probablemente el sitio de unión a las subunidades del pilus (Slonim y col., 1992).

1.3. IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA.

Aunque la principal función de la mitocondria es el aprovisionamiento energético de la célula eucariota mediante la fosforilación oxidativa, también interviene en la síntesis de metabolitos clave para el funcionamiento celular (amino ácidos, grupo hemo, pirimidinas, etc), lo que hace a este orgánulo esencial para el funcionamiento de la célula eucariota, incluso en condiciones anaerobias. Por este motivo, el conocimiento de los mecanismos responsables de la biogénesis mitocondrial ha constituido un problema esencial desde los comienzos de la biología celular y aún hoy en día representa un activo campo de investigación a nivel mundial. Por esta razón, y porque dos de los objetivos fundamentales del trabajo aquí presentado han sido, por un lado, la identificación de una familia de proteínas mitocondriales posiblemente implicadas en la biogénesis de dichos orgánulos y por otro, el estudio del procesamiento de ciertos precursores mitocondriales, consideramos interesante el analizar de forma somera los conocimientos actuales que se disponen sobre el tema, centrándonos principalmente en la importación de proteínas a la mitocondria. Revisiones sobre otros aspectos de la biogénesis mitocondrial (replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial, regulación de su actividad ,etc) han sido editadas recientemente (Attardi y Schatz, 1988; Grivell, 1989).

La mayoría de las proteínas mitocondriales (más del 95%) son codificadas por el genoma nuclear y sintetizadas como precursores en polisomas citosólicos. Estos precursores son específicamente dirigidos a la mitocondria y translocados hasta su destino submitocondrial final donde pasarán a formar parte de complejos multiproteicos funcionales. El proceso global que lleva a la síntesis del precursor hasta su incorporación en la mitocondria pasa por las siguientes fases:

- Síntesis de precursores y estabilización de éstos en el citosol.
- Interacción con receptores de la membrana externa mitocondrial.
- Inserción de los precursores en la membrana externa, seguida de translocación a través de la membrana interna.
- Interacción con hsp70 mitocondrial para finalizar la translocación total del precursor de forma ATP-dependiente.
- Eliminación proteolítica de las presecuencias mediante metaloproteasas localizadas en la matriz.
- Transferencia de las proteínas importadas desde hsp70 hacia hsp60 donde se produce el plegamiento de forma ATP-dependiente.
- Ensamblaje de las proteínas importadas en los complejos multiproteicos funcionales.

Cada una de las etapas anteriormente enunciadas será analizadas con más detalle, así como los componentes moleculares específicos implicados en cada una de ellas. Un modelo hipotético de la ruta general de importación de precursores proteicos a la matriz de la mitocondria se muestra en la figura 1.3.

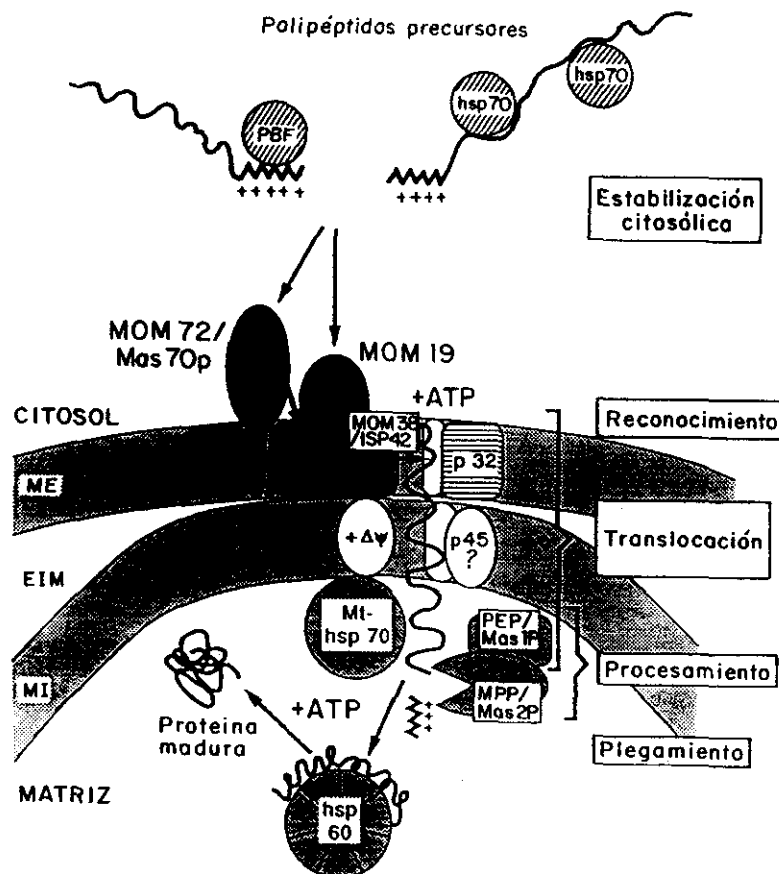


Figura 1.3. Ilustración esquemática sobre la posible ruta general de importación de precursores polipeptídicos a la matriz mitocondrial y los componentes moleculares requeridos para dicho proceso. A la derecha se indican las distintas etapas en las que se puede dividir conceptualmente el proceso global de importación. Se indican además las denominaciones alternativas propuestas por distintos grupos para proteínas de función aparentemente equivalente identificadas en *S.cerevisiae* y *N.crassa*. Adaptada de Pfanner y Weinzierl (1992).

1.3.1 Precursores proteicos mitocondriales.

La mayoría de los precursores mitocondriales se sintetizan con una extensión N-terminal cuya función es la de dirigir el precursor a la mitocondria mediante la interacción con receptores de la membrana externa mitocondrial y que posteriormente son eliminadas en el interior de la mitocondria por proteasas específicas. Estas presecuencias son capaces de dirigir proteínas citosólicas a la mitocondria (Hurt y col., 1984; Horwich, 1985; Emr y col., 1986) e incluso mantienen su función después de perder parte de sus amino ácidos (Hurt y col., 1986; Keng y col., 1986).

Las presecuencias de "targeting" a la matriz no presentan evidentes homologías entre sí, a excepción de un predominio de residuos básicos e hidroxilados, y una ausencia casi completa de residuos ácidos (Von Heijne, 1986; Von Heijne y col., 1989), y de la presencia en algunos precursores de un residuo de Arg en la posición -2 con respecto al inicio de la proteína madura. Esto parece indicar que el reconocimiento de los pre-péptidos por los receptores mitocondriales parece depender de la presencia de estructuras de orden superior más que de regiones con secuencias consenso en la estructura primaria. Así, análisis teóricos asistidos por ordenador (Von Heijne y col., 1989) y estudios biofísicos con péptidos sintéticos (Roise y col., 1986; Roise y col., 1988) indican que muchas presecuencias mitocondriales tiende a adquirir estructura de α -hélice anfifílica. De hecho, muchas secuencias artificiales y aleatorias no implicadas en el "targeting" mitocondrial son capaces de promover el transporte de precursores a la mitocondria (Hurt y col., 1986; Allison y Schatz, 1986; Hurt y Schatz, 1987; Baker y Schatz, 1987; Vassarotti y col., 1987; Banroques y col., 1987; Bibus y col., 1988; Bedwell y col., 1989; Lemire y col., 1989), aunque en general funcionan de forma poco eficiente.

1.3.2. Síntesis de precursores y estabilización de éstos en el citosol.

Los precursores mitocondriales se sintetizan en condiciones normales en polisomas libres y son importadas de forma post-traduccionaI tanto *in vivo* (Reid y Schatz, 1982a y b) como *in vitro* (Maccellini y col., 1979), aunque el bloqueo de la elongación de la síntesis proteica con cicloheximida permite la copurificación de polisomas y mitocondrias (Suissa y Schatz, 1982).

Dado que los polipéptidos en estado nativo no pueden atravesar las membranas mitocondriales (Eilers y Schatz, 1986; Chen y Douglas, 1987; Schleyer y Neupert, 1985), las células han desarrollado un conjunto de factores proteicos capaces de prevenir el plegamiento prematuro de los precursores mitocondriales en el citosol. Estos factores

incluyen varios miembros de la familia de las hsp70 (ver Sección 1.2.3.), que resultan necesarios tanto *in vivo* como *in vitro* para la estabilización de precursores mitocondriales de secreción (Chirico y col., 1988; Desahies y col., 1988; Murakami y col., 1988). En otros sistemas, la disociación de los complejos formados entre hsp70 y su sustrato polipeptídico requiere ATP (Rothman y Schmid, 1986), por lo que parece que el ATP extramitocondrial es necesario para garantizar el funcionamiento de hsp70 y mantener al precursor en una conformación desplegada competente para su translocación. De hecho, la desnaturalización previa del precursor con urea permite su importación en ausencia de factores citosólicos (Chirico y col., 1988).

Además de las hsp70, la importación de precursores mitocondriales en levadura requiere al menos de otra proteína citosólica caracterizada por ser sensible a agentes alquilantes de residuos sulfidrilos (N-etil maleimida) (Murakami y col., 1988). Otros factores citosólicos necesarios para la eficiente importación de precursores a la mitocondria han sido purificados de reticulocitos de conejo y se han denominado genéricamente PBF ("presequence binding factors") (ver Sección 1.2.5.), ya que se unen específicamente a las presecuencias de los precursores. Las PBF incluyen una proteína de 50 kDa, presente en la célula como una partícula de 5.5S (Murakami y Mori, 1990; Murakami y col., 1990), y otra de 28 kDa (Ono y Tuboi, 1990).

No todos los precursores requieren de factores citosólicos para su importación *in vitro*, así, la 3-oxoacil-CoA tiolasa no parece interaccionar con PBF (Murakami y col., 1992), a diferencia de otros precursores que sí lo hacen (Murakami y col., 1992). El precursor artificial pCOXIV-DHFR (constituido por la presecuencia de la subunidad IV de la citocromo oxidasa fusionada a la dihidrofolato reductasa de ratón) no requiere de factores citosólicos para su importación *in vitro* (Eilers y Schatz, 1986) y varios precursores destinados al espacio intemembrana de la mitocondria [citocromo c (Nicholson y col., 1988) y adenilato quinasa (Magdolen y col., 1987)] no requieren ATP para su translocación, lo que parece sugerir una importación independiente de hsp70.

1.3.3 Reconocimiento de los precursores por receptores de la membrana externa mitocondrial.

La importación a la mitocondria de la mayoría de los precursores es inhibida tras el tratamiento de la mitocondria con proteasas (Riezman y col., 1983) o anticuerpos contra proteínas de la membrana externa mitocondrial (Zwizinski y col., 1984; Ohba y Schatz, 1987), lo que hizo suponer la existencia en la membrana externa mitocondrial de

polipéptidos receptores de los precursores mitocondriales (Zwizinski y col., 1984; Pfaller y col., 1988).

En mitocondrias de *N.crassa*, dos proteínas periféricas de la membrana externa que presentan grandes dominios hidrofílicos expuestos al citosol han sido identificadas como receptores para distintos precursores. Se trata de MOM19 (mitochondrial outer membrane de 19 kDa) que parece ser el receptor de la mayoría de precursores que llevan presecuencia amino terminal (Söllner y col., 1989; Steger y col., 1990), y de MOM72 que funciona como receptor para el translocador de nucleótidos de adenina, proteína de la membrana interna mitocondrial, que carece de presecuencia procesable (Söllner y col., 1990). Las especificidades de ambos receptores no son exclusivas ya que el translocador de nucleótidos de adenina puede ser importado a través de MOM19 con baja eficiencia y precursores normalmente importados mediante MOM19 pueden también usar MOM72. La importación de MOM19 es independiente de receptores en la membrana externa mitocondrial ya que interacciona con un componente posterior de la ruta de importación (MOM38) (Schneider y col., 1991). El receptor de MOM72 parece ser MOM19 (Söllner y col., 1990).

En *S.cerevisiae*, se ha identificado una proteína de 70 kDa (Mas70p) que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y expone al citosol un dominio hidrofílico de 60 kDa (Hase y col., 1984; Hase y col., 1983). Esta proteína es necesaria para la importación *in vitro* de precursores con presecuencia (subunidad β del complejo F1-ATPasa) o sin ella (translocador de nucleótidos de adenina). Estudios *in vivo* con mutantes de delección de esta proteína (Hines y col., 1990) indican que la importación de todos los precursores analizados se encuentra alterada, sugiriendo así un papel receptor mucho más amplio.

El uso de anticuerpos antiidiotipo contra un péptido correspondiente a una presecuencia de un precursor mitocondrial ha permitido la identificación de una proteína de 32 kDa en *S.cerevisiae* (Pain y col., 1990) que interacciona con precursores unidos a la superficie mitocondrial. Además, anticuerpos obtenidos contra esta proteína inhiben la importación *in vitro* de varios precursores. Sorprendentemente, la secuencia de esta proteína es idéntica a la del translocador de fosfato, una proteína de la membrana interna mitocondrial (Phelps y col., 1991). El significado de esta aparente bifuncionalidad no está claro.

1.3.4 Canales de translocación de proteínas.

La importación *in vitro* de precursores en mitocondrias aisladas incubadas a baja temperatura, o en ausencia de potencial de membrana, resulta en la acumulación de intermedios de translocación en los que los precursores mitocondriales se encuentran atravesando las 2 membranas quedando su extremo N-terminal en la matriz mitocondrial (Rassow y col., 1989; Schelyer y Neupert, 1985; Vestweber y Schatz, 1988). Estos precursores pueden ser solubilizados por tratamiento con urea o en medio básico (Pfanner y col., 1987a; Sztul y col., 1988), lo que sugiere que están asociados a un canal hidrofílico y no directamente anclados en los fosfolípidos de la membrana. La composición de este canal hidrofílico de la membrana externa mitocondrial (denominado GIP por General Insertion Protein) en mitocondrias de *N.crassa* ha sido estudiado mediante "cross-linking" de precursores parcialmente translocados y posterior inmunoprecipitación. El primer componente identificado fue MOM38, que se encuentra asociada a los receptores MOM19 y MOM72 en forma de complejo de alto peso molecular (Kiebler y col., 1990). Otros componentes identificados posteriormente han sido MOM7, MOM8, MOM22 y MOM30 (Söllner y col., 1992). En mitocondrias de *S.cerevisiae* se identificó inicialmente una proteína de 42 kDa con un 40% de identidad aminoacídica con MOM38 y que es esencial para la viabilidad celular (Baker y col., 1990). Esta proteína se denominó ISP42 (por import site protein of 42 kDa) y parece constituir el homólogo funcional de MOM38. El resto de componentes del "import site" de *S.cerevisiae* han sido recientemente identificados y presentan un patrón de polipéptidos muy semejante al de *N.crassa* (Moczko y col., 1992).

El diametro de estos canales proteicos no es conocido con exactitud, pero se sabe que son capaces de permitir la translocación de complejos proteína-DNA (Vestweber y Schatz, 1989), cuyo diámetro es de aproximadamente 20 Å.

Hasta la fecha, solamente se ha identificado una proteína de 45 kDa como posible componente del canal de translocación de proteínas de la membrana interna mitocondrial (Scherer y col., 1992).

1.3.5 Transporte y maduración de precursores en la matriz mitocondrial.

La mayor parte de los precursores cuya localización submitocondrial final es la matriz de la mitocondria se sintetizan con una presecuencia N-terminal procesable que permite la interacción con el receptor de la membrana externa. Estos precursores son posteriormente insertados a través de canales de naturaleza proteica y una vez en la matriz,

interaccionan sucesivamente con hsp70 y hsp60 y son procesados para eliminar la presecuencia (ver Figura 1.3). Las presecuencias amino-terminales de todos aquellos precursores que la contienen son eliminadas en la matriz mitocondrial mediante una metaloproteasa. Esta proteasa es un heterodímero soluble de 100 kDa que ha sido purificada de levadura (Yang y col., 1988), *N.crassa* (Hawltischek y col., 1988) e hígado de rata (Kleiber y col., 1990; Ou y col., 1989). La proteasa de *N.crassa* está constituida por 2 subunidades, MPP (matrix processing peptidase) y PEP (processing enhancing protein), de las que MPP es la que posee la capacidad catalítica, mientras que PEP incrementa considerablemente la actividad proteolítica de MPP (Hawltischek y col., 1988). Las secuencias de las 2 subunidades son muy semejantes tanto en *S.cerevisiae* como en *N.crassa* (Pollock y col., 1988; Jensen y Yaffe, 1988; Witte y col., 1988). En levaduras, la inactivación o delección de cualquiera de las 2 subunidades resulta incompatible con la viabilidad celular (Baker y Schatz, 1991).

Algunos precursores sufren un doble procesamiento en la matriz cuyo objetivo parece ser el conseguir el correcto extremo amino, más que promover el "sorting" posterior a otro compartimento mitocondrial. Este tipo de doble procesamiento se ha demostrado para la malato deshidrogenasa (Kalousek y col., 1988) y la ornitina transcarbamilasa (Sztul y col., 1987). La primera reacción proteolítica es catalizada por la metalo proteasa de la matriz, dando lugar así a una forma intermedia cuyo octapéptido amino-terminal presenta la secuencia consenso FXXSXXXX (Hendrick y col., 1989). La formación de la proteína madura es catalizada por la denominada peptidasa intermedia mitocondrial (MIP), que elimina el octapéptido amino-terminal (Isaya y col., 1991). MIP es una proteína monomérica de 75 kDa cuya actividad es dependiente de cationes divalentes (Kalousek y col., 1992). La secuencia de MIP de hígado de rata presenta ciertas homologías con una subclase de metalo-endorpeptidasas implicadas en la degradación de péptidos bioactivos (Conlin y Miller, 1992), según se ha descrito recientemente (Isaya y col., 1992). Todos los precursores en los que se ha propuesto un doble procesamiento en la matriz mitocondrial presentan un residuo de arginina en la posición -10 con respecto al inicio de la proteína madura (Hendrick y col., 1989).

A medida que el precursor atraviesa la membrana interna mitocondrial y aparece en la matriz, se une al representante mitocondrial de la familia de las hsp70, como demuestra el hecho de que precursores auténticos, así como precursores artificiales bloqueados en los canales de importación, pueden ser unidos covalentemente o co-inmunoprecipitados junto con mt-hsp70 (Kang y col., 1990; Scherer y col., 1990). La función de mt-hsp70 parece ser la de facilitar la translocación completa del precursor hacia la matriz mitocondrial. De hecho, la inactivación de esta proteína provoca el bloqueo de la

importación *in vitro*, quedando el precursor atravesando las 2 membranas mitocondriales (Kang y col., 1990). La unión de precursores a hsp70 es revertida por la hidrólisis de ATP (Manning-Krieg y col., 1991), por lo que se piensa que el requerimiento intramitocondrial de ATP para una importación eficiente de precursores es debido a la actividad de mt-hsp70 (Hwang y Scahtz, 1989). Mt-hsp70 está codificada por el genoma nuclear (Craig y col., 1989) y resulta esencial para la viabilidad celular (Craig y col., 1987).

La mitocondria de todos los organismos estudiados contiene en su matriz un miembro de la familia de las chaperoninas denominada hsp60 o cpn60 (McMullin y Hallberg, 1987; McMullin y Hallberg, 1988) (ver Sección 1.2.2.). Esta proteína es necesaria para el ensamblaje final de los complejos multienzimáticos de la matriz y de la membrana interna mitocondrial (Cheng y col., 1989), así como para el plegamiento de precursores mitocondriales (Ostermann y col., 1989). Los monómeros de 60 kda están codificados por un gen nuclear cuya delección resulta incompatible con la vida (Cheng y col., 1989).

Todas las etapas anteriormente enunciadas constituyen la vía "por defecto" para la importación de precursores a la matriz mitocondrial. Sin embargo, la translocación de precursores a otros compartimentos mitocondriales puede requerir de etapas adicionales (p.ej. precursores del espacio intermembrana) o bien puede detenerse en un paso intermedio, compartiendo sólo parte de la maquinaria proteica con la ruta general de importación (p.ej. precursores de membrana externa o algunos de membrana interna).

1.3.7 Transporte de precursores a distintos compartimentos submitocondriales.

1.3.7.1 Transporte de precursores a la membrana externa mitocondrial.

La biogénesis de las proteínas de la membrana externa mitocondrial es con diferencia uno de los aspectos menos conocidos de la importación de proteínas a la mitocondria. Algunos precursores de la membrana externa mitocondrial carecen de presecuencia N-terminal y no requieren de potencial electroquímico en la membrana interna para su ensamblaje (Freitag y col., 1982; Gasser y Schatz, 1983; Mihara, 1982). Tal es el caso de la porina (Hamajima y col., 1988), MOM38/ISP42 (Baker y Schatz, 1990) y MOM72 de *N.crassa* (Kiebler y col., 1990). Parece probable que las proteínas de membrana externa compartan con otros precursores mitocondriales las primeras etapas de

la translocación, como demuestra el hecho de que una sustitución conservativa de un residuo en una proteína de la membrana externa provoque un redireccionamiento de ésta a la matriz (Hase y col., 1984), y por otro lado, de que la introducción de una región hidrofóbica cerca del extremo amino de la presecuencia de una proteína de matriz origine la retención de ésta en la membrana externa (Nguyen y col., 1988).

Otros precursores de la membrana externa mitocondrial (p.ej. el receptor Mas70p de *S.cerevisiae*) presentan típicas presecuencias N-terminales de "targeting" a la matriz mitocondrial, pero son retenidos en la membrana externa por medio de una región hidrofóbica que solapa parcialmente con la secuencia señal (Hase y col., 1984; Hurt y col., 1985). Sin embargo, esta teoría no explica como otros precursores con una presecuencia compuesta por una secuencia señal hidrofílica típica seguida por una serie de residuos hidrofóbicos se localizan en el espacio intermembrana. La sustitución en Mas70p de la primera porción de la presecuencia por la presecuencia de un precursor localizado en la matriz, da lugar a una orientación invertida localizándose el extremo amino orientado hacia el citosol (Li y Shore, 1992).

Un tercer tipo de mecanismo de "targeting" a la membrana externa mitocondrial es el empleado por la monoamino oxidasa B. Esta proteína contiene una señal de targeting cerca de su extremo carboxilo (Mitoma e Ito, 1992) y su inserción en la membrana externa *in vivo* requiere ubiquitina (Zhuang y McCauley, 1989).

1.3.7.2 Transporte de precursores al espacio intermembrana.

Podemos encontrar al menos 3 tipos de mecanismos distintos y excluyentes para el transporte de proteínas al espacio intermembrana de la mitocondria.

El primero es el empleado por el citocromo c (Nicholson y col., 1989), adenilato quinasa (Magdolen y col., 1987) y citocromo c hemo liasa (Lill y col., 1992), caracterizado por ser independiente de la presencia de ATP en el exterior de la mitocondria y de potencial electroquímico, y porque los precursores de citocromo c carecen de presecuencias procesables. Sin embargo, mientras que el precursor del citocromo c no requiere de ningún componente de la membrana externa mitocondrial, pues interacciona directamente con la citocromo c hemo liasa que actúa como receptor de alta afinidad en el espacio intermembrana (Stuart y Neupert, 1990), el precursor de la citocromo c hemo liasa es importado al espacio intermembrana a través de su interacción con MOM19 y MOM38 (Lill y col., 1992).

El segundo mecanismo descrito es el empleado por el precursor del complejo Fe-S del complejo ubiquinol:citocromo c reductasa. Esta proteína es translocada por completo a la matriz y posteriormente integrada en el complejo bc1 por un mecanismo desconocido (Fu y col., 1990; Hartl y col., 1986).

El tercer mecanismo alternativo para el transporte al espacio intermembrana es aquel empleado por los precursores que contienen una secuencia señal compuesta por una presecuencia típica de "targeting" a la matriz seguida por una serie de residuos hidrofóbicos. Podemos encontrar ejemplos de este tipo de precursores en la citocromo c peroxidasa (Kaput y col., 1982), citocromo c1 (Sadler y col., 1984), citocromo b2 (Guiard, 1985) y la isoenzima mitocondrial de la creatina quinasa (Haas y Strauss, 1990). Se han propuesto los 2 modelos siguientes para explicar el "targeting" de este tipo de precursores:

1.- La región hidrofóbica actúa como una secuencia stop-transfer, de forma que el precursor comienza a ser translocado a través de la membrana interna mitocondrial hasta que su extremo N-terminal alcanza la matriz donde la primera parte de la presecuencia es eliminada. La región hidrofóbica de la presecuencia impide la posterior translocación del resto del precursor permaneciendo éste en el espacio intermembrana donde se elimina la segunda parte de la presecuencia por medio de las proteasas mitocondrial del espacio intermembrana (Hurt y Van Loon, 1986; Nguyen y col., 1988, Van Loon y Schatz, 1987).

2.- El modelo denominado de "sorting" conservativo implica que el precursor es translocado totalmente a la matriz mitocondrial donde pierde la primera porción de la presecuencia e interacciona con hsp60. La interacción de la forma intermedia del precursor con hsp60 impide el plegamiento prematuro de aquel en la matriz y facilita su re-exportación posterior hacia el espacio intermembrana, por un mecanismo reminiscente de la secreción proteica al espacio periplásmico en procariotes, empleando la región hidrofóbica de la presecuencia como secuencia señal (Hartl y Neupert, 1990; Hartl, 1987).

Tanto el modelo de "stop-transfer" (Glick y col., 1992) como el de sorting conservativo (Koll y col., 1992) se encuentran apoyados por numerosas evidencias experimentales. La principal diferencia entre ambos mecanismos radica en que el modelo de sorting conservativo supone que existe una interacción directa de la forma intermedia del precursor con hsp60 en la matriz, y que es requerido ATP en dicho compartimento. Sin embargo, ambos modelos permiten explicar el hecho de que la eliminación de la

región hidrofóbica de la presecuencia determine la localización del precursor en la matriz mitocondrial (Van Loon y col., 1987).

1.3.7.3 Transporte de precursores a la membrana interna mitocondrial.

Se han identificado 2 mecanismos para explicar el "targeting" de los distintos precursores a la membrana interna mitocondrial. Por un lado, el translocador de nucleótidos de adenina es sintetizado sin presecuencia procesable. Se ha comprobado que la información necesaria para su "targeting" radica en regiones internas de la proteína (Pfanner y col., 1987b; Smagula y Douglas, 1988). Este precursor interacciona inicialmente con MOM72/Mas70p (Söllner y col., 1990), pero no con hsp60, por lo que se supone que es translocado directamente a la membrana interna de la mitocondria, donde se ancla mediante 3 pares de hélices anfifílicas (Klingerberg y col., 1989). Este mecanismo parece ser compartido por otros precursores de la membrana interna que están estructural y funcionalmente relacionados con el translocador de nucleótidos de adenina, como son, la proteína desacoplante del tejido adiposo marrón (Liu y col., 1990), el transportador de oxocetoglutarato y el transportador de fosfato de levadura (Murakami et al., 1990) y de mamíferos. Este último se sintetiza con una presecuencia N-terminal (Runswick y col., 1987), pero que puede ser eliminada sin alterar de forma sustancial la eficacia de su importación *in vitro* (Zara y col., 1992).

Otros precursores del espacio intermembrana siguen una suerte de "sorting" conservativo, puesto que son translocados totalmente a la matriz para insertarse posteriormente en la membrana interna. Este mecanismo ha sido observado para el precursor de la subunidad IV de la citocromo oxidasa (Maarse y col., 1984) en levadura y para el precursor de la subunidad 9 del complejo F0 de *N.crassa* (Mahlke y col., 1990). Todas estas proteínas presentan regiones altamente hidrofóbicas cuya función puede ser la de facilitar el paso a través de la bicapa lipídica o la de actuar como una secuencia "stop-transfer".

1.4. ATPasas TRANSLOCADORAS DE IONES.

1.4.1. Aspectos generales.

En términos globales, el metabolismo energético celular resulta del balance entre la síntesis de ATP y de todos aquellos procesos endergónicos cuyos requerimientos energéticos son cubiertos por esta molécula (biosíntesis de macromoléculas, transporte de iones en contra de gradientes osmóticos, generación de potenciales eléctricos y/o químicos a través de membranas, emisión de luz en organismos bioluminiscentes, trabajo mecánico, etc).

Sin embargo, el ATP no es proporcionado como tal por la naturaleza, sino que debe ser sintetizado por la célula a partir de ADP y fosfato mediante un proceso endergónico. La fuente inicial de energía de los seres vivos lo constituyen las reacciones acopladas de oxidoreducción entre un donante reducido y un aceptor oxidado cuyo potencial redox es lo suficientemente elevado como para que la transferencia de electrones entre ambas moléculas proporcione la energía necesaria para la síntesis de una molécula de ATP a partir de ADP y fosfato, proceso conocido como fosforilación oxidativa. Los organismos autótrofos son capaces de obtener electrones de alto nivel energético a partir de la energía lumínica (fotótrofos) o de compuestos inorgánicos (quimiolitótrofos), mientras que los organismos heterótrofos necesitan de compuestos orgánicos de mayor complejidad para este fin.

El mecanismo por el que se produce el acoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ATP fue propuesto inicialmente por Mitchell (1974) bajo el nombre de teoría quimiosmótica. La base de esta transducción energética radica en que el flujo de electrones a través de una cadena de aceptores/donadores está obligatoriamente acoplado a la translocación simultánea de protones a través de una membrana biológica, dando lugar así a la aparición de un potencial electroquímico de una magnitud similar al potencial redox entre 2 eslabones de la cadena transportadora de electrones. El potencial electroquímico de membrana así generado es empleado posteriormente para la síntesis de ATP por medio de complejos proteicos especializados capaces de acoplar ambos procesos.

Dado el papel fundamental que los gradientes de protones desempeñan en la transducción de energía, no resulta sorprendente que todas las células dispongan de una superfamilia de enzimas especializadas en generar gradientes de protones mediante la

hidrólisis de ATP por un lado, y de sintetizar ATP a expensas de la fuerza protonmotriz, por otro. Estas enzimas, conocidas genéricamente como ATPasas translocadoras de iones, aparecen en todos los organismos estudiados hasta la fecha, presentan un alto grado de similitud estructural y de secuencia, y probablemente aparecieron en la evolución de forma muy temprana, características todas ellas indicativas del papel fundamental que estas proteínas desempeñan en la biología celular.

1.4.2. Clasificación de las ATPasas translocadoras de iones.

Todas las ATPasas transportadoras de iones identificadas pueden ser agrupadas en tres grandes categorías que se conocen como P-, V- y F-ATPasas.

La familia de las ATPasas tipo P incluye todas aquellas cuya función requiere de la formación de intermedio fosforilado. Dentro de este grupo se incluyen la Na⁺/K⁺-ATPasa (Shull y col., 1985), la Ca²⁺-ATPasa (James et al., 1988) y la H⁺-ATPasa (Goffeau y Slayman, 1981) de la membrana plasmática de células eucariotas, la Ca²⁺-ATPasa del retículo endoplásmico (MacLennan y col., 1989) y la K⁺-ATPasa de células eucariotas (Perlin y col. 1985).

Las ATPasas tipo V comprenden todas aquellas que se encuentran asociadas a las membranas de los orgánulos que constituyen el sistema de citomembrana de células eucariotas (lisosoma, vacuolas de plantas y hongos, endosomas, vesículas recubiertas de clatrina y vesículas sinápticas) y en las membranas plasmáticas de arqueobacterias. Todas las V-ATPasas originan una acidificación limitada en el interior del compartimento al que están asociadas mediante el transporte de protones a su interior acoplado a la hidrólisis del ATP, a excepción de las presentes en arqueobacterias, que se encargan de la síntesis de ATP (ver revisiones de Al Awqati, 1986; Pedersen y Carafoli, 1987a y b; Nelson, 1991, 1992a y b).

Las ATPasas tipo F se encuentran en la membrana plasmática de eubacterias, en la membrana interna de las mitocondrias de células eucariotas y en la membrana de los tilacoides en cloroplastos. Se encargan de la síntesis de ATP a expensas de la fuerza protónmotriz existente entre los dos compartimentos delimitados por la membrana en la que se encuentran, aunque bajo ciertas circunstancias pueden funcionar como bombas de protones dependientes de ATP (ver revisiones de Al Awqati, 1986; Pedersen y Carafoli, 1987a y b; Nelson, 1991, 1992a y b).

En el panorama global del metabolismo energético celular, las F-ATPasas funcionan obligatoriamente en la dirección de síntesis de ATP, proporcionando energía que es transformada en trabajo por las demás ATPasas, que funcionan exclusivamente en la dirección de hidrólisis de ATP.

La tabla 1.2 muestra las características de cada una de las familias de ATPasas anteriormente indicadas.

Tabla 1.2 Resumen de las características bioquímicas y estructurales de los 3 tipos de ATPasas translocadoras de iones.

	P-ATPasas	V-ATPasas	F-ATPasas
Sustratos iónicos	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ⁺ /H ⁺	H ⁺	H ⁺
Modificación covalente	Si	No	No
Localización	Membrana plasmática. Membrana RE. Mucosa gástrica.	Membrana de las vesículas del sistema de citomembrana de células eucariotas. Membrana plasmática arqueobacterias	Membrana interna mitocondrial. Membrana tilacoides. Membrana plasmática eubacterias.
Función	Translocación de iones	Translocación de protones	Síntesis de ATP
Inhibidores específicos	Vanadato DCCD	NEM DCCD Cl ⁻ NO ₃ ⁻	Oligomicina DCCD Azida
Composición y estequiometría	α1 β1	A3 72 B3 57 C 44 D 34 E 26	α3---55 β3---50 γ---31 δ---20 ε---15
Subunidad catalítica	α	A	β

1.4.2.1. *P-ATPasas.*

La principal característica diferenciadora de esta subclase de ATPasas translocadoras de iones es que son fosforiladas durante el ciclo de reacción mediante la adición covalente del γ -fosfato del ATP a un residuo de Asp altamente conservado en la secuencia de todas las ATPasas (Nishigaki y col. 1974; Dane y col. 1981). La formación del intermedio fosforilado conlleva una modificación conformacional de la proteína, como demuestra la alteración en el espectro de dicroísmo circular y en la fluorescencia intrínseca (Dupont, 1976) así como en la resistencia a proteasas (Benaïm y col. 1986). Todas las P-ATPasas son inhibidas por vanadato, un análogo estructural del fosfato capaz de sustituir a éste en el centro activo de la enzima (Macara, 1980).

Desde el punto de vista estructural, las P-ATPasas están constituidas por una única subunidad, denominada α , de 70-100 kDa que contiene el sitio de fosforilación y los dominios implicados en la translocación de iones. La Na^+/K^+ -ATPasa de la membrana plasmática de células eucariotas contiene además una subunidad β de 55 kDa de función desconocida.

La comparación de las secuencias entre los distintos miembros de esta familia (Shull y col., 1985; Kawakami y col., 1985; MacLennan y col. 1985; Serrano y col. 1986) indica la existencia de un alto grado de conservación en la estructura primaria de la distintas ATPasas, por lo que probablemente derivan todas ellas de un único antepasado común. Esta similitud de secuencia es máxima en torno al sitio de fosforilación, cuya secuencia es Asp*-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu(Ile)-Thr, que se encuentra presente en la Na^+/K^+ -ATPasa, la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática y las K^+ -ATPasas bacterianas, por lo que es posible que todas las P-ATPasas compartan el mismo mecanismo de acción. Según el modelo de estructura terciaria propuesto para la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico, basada en datos bioquímicos y en la secuencia de aminoácidos, esta proteína presentaría 10 dominios transmembrana. Tanto los sitios de fosforilación, como de unión a ATP y de unión a Ca^{2+} se localizarían en un dominio globular situado en el lado citosólico de la proteína (MacLennan y col., 1985).

Se desconoce si el acoplamiento energético entre la formación de aminoacil-fosfato y la translocación iónica se produce de forma directa, esto es, existe interacción directa entre el ion y el grupo fosfato o de forma indirecta, en cuyo caso la formación del intermedio fosforilado provocaría un cambio conformacional que a su vez induciría la translocación del ion. Aparentemente, en la Ca^{2+} -ATPasa, el sitio de fosforilación parece estar alejado del sitio de unión al ion (MacLennan y col. 1985). Las P-ATPasas contienen

sitios de unión al ion de alta y baja afinidad, localizados respectivamente en la superficie citosólica y en segmentos de membrana orientados hacia el lado luminal (MacLennan y col. 1985). Se ha propuesto que la fosforilación de la enzima provoca una translocación de los iones desde sitios de alta a baja afinidad. Las P-ATPasas presentan dos regiones transmembrana altamente conservadas (H3 y H4) que se encuentran entre el sitio de fosforilación y los sitios putativos de unión a iones (MacLennan y col. 1985; Shull y col. 1985; Kawakami y col. 1985). Se ha sugerido la posibilidad de que estas regiones estén implicadas en el acoplamiento energético (Shull y col. 1985).

1.4.2.2. *V-ATPasas*.

Se encuentran asociadas a la membrana de los orgánulos que constituyen el sistema vacuolar de las células eucariotas y en la membrana plasmática de arqueobacterias. Funcionan exclusivamente como bombas de protones ATP-dependientes, provocando una acidificación limitada en el interior de lisosomas, vacuolas de plantas y hongos, endosomas, vesículas recubiertas de clatrina y vesículas sinápticas (Nelson, 1989, 1991).

Desde el punto de vista estructural, están formadas por dos sectores bien diferenciados, el sector V1, catalítico, hidrofílico y que contiene el sitio de unión de ATP y el sector V0, altamente hidrofóbico, que se encuentra integrado en la bicapa lipídica y funciona como canal de protones. Ambos sectores son funcionalmente interdependientes, de forma que la región V1 solubilizada carece de actividad ATPasa (Moriyama y Nelson, 1989a) y el sector V0 es incapaz de translocar protones tras la eliminación de V1 (Beltran y Nelson, 1992). El sector V1 está compuesto por cinco subunidades denominadas A,B,C,D y E, con una estequiometría del tipo A₃B₃CDE (Fig. 1.4) y con pesos moleculares que oscilan entre 70 kDa (A) y 26 kDa (E) (Nelson, 1989, Moriyama y Nelson, 1989c). La ATPasa de gránulos cromafines contiene subunidades de 140, 70, 57, 41, 33 y 16 kDa y la ATPasa presente en las vesículas recubiertas de clatrina contiene subunidades de 116, 70, 58. 40 y 34 kDa, lo que sugiere la existencia de componentes aún no caracterizados. Hasta la fecha, el único componente identificado en el sector V0 es el denominado proteolípido o proteína de unión a DCCD, una proteína de 16 kDa altamente hidrofóbica soluble en cloroformo/metanol y aparentemente responsable de la unidireccionalidad funcional de las V-ATPasa (Moriyama y Nelson, 1988). En algunas preparaciones de V0 se ha identificado un polipéptido de 20 kDa muy hidrofóbico (Moriyama y Nelson, 1989b).

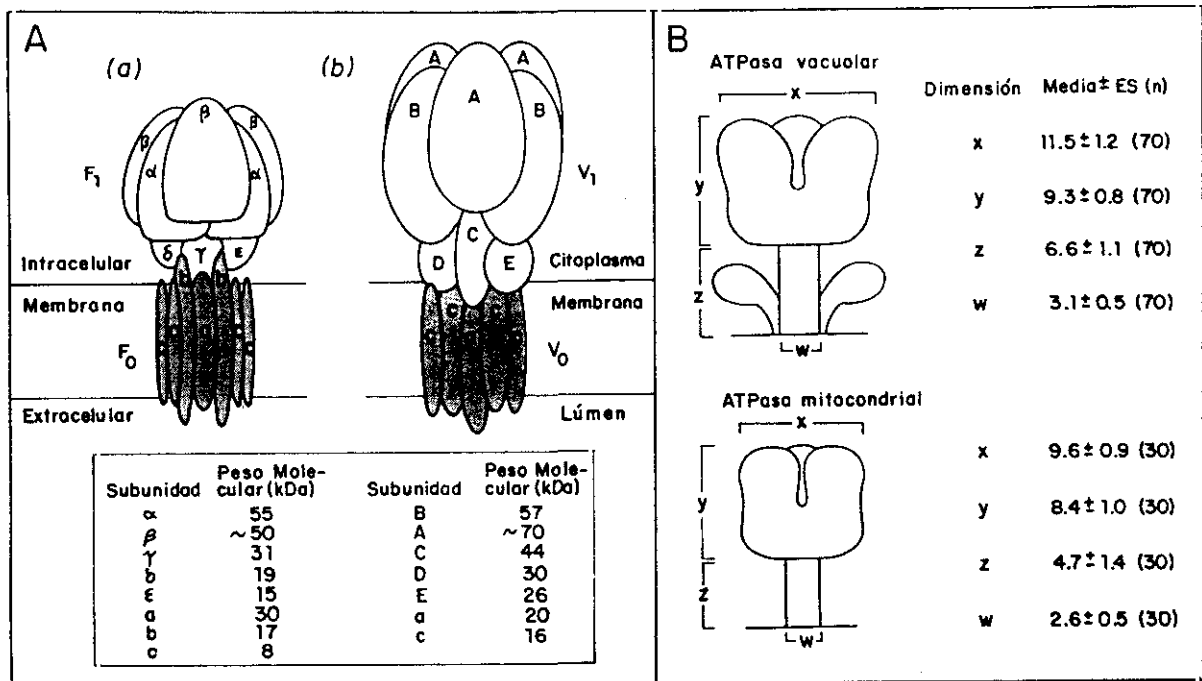


Figura 1.4. Modelo de la composición, estequiometría y dimensiones de las ATPasas de tipo F y V.

(A) Distribución de subunidades en las F- y V-ATPasas. Como modelo de F-ATPasa se ha elegido la de *E.coli*, cuya composición es bien conocida ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{2-10}$). El modelo de V-ATPasa se ha elaborado en base a los polipéptidos identificados en preparaciones de ATPasas vacuolares de distintos organismos. La subunidad a del sector de membrana en la V-ATPasa es hipotética (según Nelson y col., 1991).

(B) Dimensiones de los sectores solubles de las ATPasas de tipo F y V obtenidos mediante estudios de microscopía electrónica. El tamaño medio y la desviación estandar vienen dados en nm (según Dschida y Bowman (1992)).

Las V-ATPasas son inhibidas por DCCD, KNO_3 , KSCN y NEM, siendo este último agente un inhibidor altamente específico de este tipo de ATPasas. A diferencia de las P-ATPasas, no requieren la formación de un intermedio fosforilado, sino que ligan ATP con gran afinidad.

Las procesos fisiológicos en los que se encuentra involucrada esta familia de ATPasas son consecuencia directa de su capacidad para acidificar distintos compartimentos intracelulares. Así, las V-ATPasas son esenciales en los siguientes procesos biológicos:

1.- Funcionalidad selectiva de enzimas lisosomales. El pH ácido de los lisosomas desnaturaliza las proteínas captadas mediante endocitosis, lo que facilita su degradación por los enzimas lisosomales que, a su vez, presentan una actividad máxima a pH ácido.

Esta característica proporciona protección a la célula en caso de ruptura lisosomal, ya que el pH relativamente alcalino del citosol inactiva las proteasas. Además, muchos zimógenos pancreáticos son inactivos a pH ácido, lo que impide su activación intralisosomal. Se ha descrito que ciertos mutantes incapaces de acidificar el lumen lisosomal presentan alteraciones en la capacidad de glicosilar proteínas (Robbins y col. 1984), lo que sugiere que las glicosil- transferasas también requieren de pH ácido para su función.

2.- Unión de ligandos, disociación y transporte. La captación de proteínas mediante endocitosis mediada por receptor se encuentra regulada por el pH ya que la unión ligando-receptor es sensible a pH ácido. De esta forma, el ligando interacciona con su receptor en la membrana plasmática y no se disocia hasta que se ha producido la internalización y la consiguiente acidificación en el endosoma, lo que permite la distribución posterior del ligando a su compartimento de destino y el reciclaje del receptor. Este mecanismo se ha demostrado para los receptores de LDL y transferrina (Goldstein y col. 1985) y para el transporte transepitelial de IgG por el epitelio intestinal neonatal (Rodewald y Kraehenbuhl, 1984). La endocitosis mediada por receptor es empleada por distintos virus y toxinas para acceder al interior celular. Así, la toxina diftérica (Sandvig y Olnes, 1980), la exotoxina de *Pseudomonas* y el virus de la gripe entran en la célula por este mecanismo.

3.- Transporte de solutos. Las V-ATPasas resultan fundamentales para la captación de aminas biogénicas y aminoácidos por parte de gránulos de secreción y vesículas de almacenamiento. La H⁺-ATPasa resulta necesaria para la captación y almacenamiento de catecolaminas en los gránulos cromafines (Beers y col. 1982), de serotonina en los gránulos de almacenamiento plaquetario y de acetilcolina en las vesículas sinápticas (Toll y Howard, 1980).

Un aspecto aparentemente contradictorio referente a la función y secuencia de las ATPasas de tipo V lo constituye por un lado la alta conservación en su composición y secuencia de los polipéptidos que la integran, y por otro su diversidad funcional al proporcionar a cada orgánulo su pH interno óptimo. Esta cualidad puede ser explicada por varios mecanismos: (i) la presencia en la membrana de muchos orgánulos de canales de cloruro que pueden contrarrestar parcialmente la modificación en el pH intraluminal a expensas del potencial de membrana, (ii) la diferente capacidad tamponadora del contenido intraluminal en los distintos componentes del sistema vacuolar, y (iii) la existencia de distintas isoformas para algunas de las subunidades de la V-ATPasas, lo que permite modular la actividad.

La disposición espacial de los sectores V1 y V0, según fue determinada inicialmente por microscopía electrónica de gránulos cromafines bovinos (Kanaseki y Katoda, 1969; Schmidt y Winkler, 1982) muestra una estructura globular anclada a la membrana a través de un tallo (Fig. 1.4). Una disposición espacial muy semejante se ha encontrado en las membranas vacuolares de *N.crassa* (Bowmann, 1989) y plantas superiores (Dschida y Bowmann, 1992 y referencias incluidas). Esta estructura es muy semejante a la de las ATPasas de tipo F. Estudios recientes de microscopía electrónica sobre la ATPasa vacuolar de *N. crassa* han permitido estimar las dimensiones del complejo (Dschida y Bowman, 1992). Así, el sector V1 es una esfera de 10 nm de diámetro y cuyo tallo conector tiene 6.6 nm de alto por 3.1 nm de diámetro (Fig. 1.4). Este mismo estudio (Dschida y Bowman, 1992) ha permitido identificar unas proyecciones basales conectadas a través del tallo que no aparecen en las F-ATPasas.

1.4.2.3. *F-ATPasas*.

Se localizan en la membrana interna mitocondrial, en la membrana de los tilacoides y en la membrana plasmática de eubacterias. Estas ATPasas funcionan muy próximas al equilibrio termodinámico, por lo que pueden catalizar la síntesis de ATP a expensas del gradiente de protones o bien generar una fuerza protonmotriz de forma ATP-dependiente (ver revisiones de Cross, 1981; Wang, 1983; Hatefi, 1985; Futai y col. 1989; Pedersen y Carafoli, 1987a y b; Amzel y Pedersen, 1983).

En general, en presencia de una adecuada fuerza protonmotriz y con cantidades suficientes de ADP y fosfato, las F-ATPasas sintetizan ATP. Sin embargo, cuando la respiración está limitada por falta de oxígeno o la fotosíntesis por falta de luz, las F-ATPasas pueden consumir el ATP existente para generar un gradiente de protones. En cloroplastos, existe un mecanismo que inhibe la hidrólisis de ATP en la oscuridad, evitando así la desaparición del ATP generado durante la fase lumínica. Este mecanismo requiere de la subunidad ϵ del sector F1 y del sistema redox proporcionado por la tiorredoxina (Jagendorf y col. 1991). La ATPasa tipo F mitocondrial también contiene un inhibidor de la actividad ATPasa que puede bloquear la actividad de hidrólisis de ATP del complejo, aunque su función no es tan evidente como la del cloroplasto (Futai y col. 1989; Senior, 1990; Penefsky y Cross, 1991).

La estructura de la F-ATPasa consta de dos sectores:

- F1. Puede ser aislado en forma soluble con actividad ATPasa y está compuesto por cinco subunidades (α , β , γ , δ y ϵ) que aparecen con una estequiometría del tipo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Sus pesos moleculares rondan los 50-60 kDa para las subunidades α y β , 30-36 kDa para la subunidad γ y menos de 20 kDa para las subunidades δ y ϵ . Esta distribución aparece de forma constante en las F-ATPasas de mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Las únicas subunidades absolutamente conservadas entre las distintas especies son las subunidades α , β y γ . La subunidades δ de *E.coli* y cloroplasto son equivalentes entre sí y a su vez equivalen a la OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein) del complejo mitocondrial bovino. Por otro lado, la subunidad ϵ de *E.coli* y cloroplastos equivale a la subunidad δ del complejo mitocondrial, mientras que la subunidad ϵ de este último carece de equivalente en los complejos de *E.coli* y cloroplastos.

- F0. Es la parte del complejo encargada de la translocación de protones y, como tal, se encuentra formando un canal a través de la bicapa lipídica. A diferencia del sector V0 de las V-ATPasas, la eliminación de F1 convierte a F0 en un canal pasivo de protones. La composición de este sector varía mucho entre las distintas especies. Así, en *E.coli* está compuesto por tres subunidades (a, b y c), presentes en una estequiometría de ab_2c_6-10 (Friedl y col. 1981). En cloroplastos aparecen cuatro subunidades (I, II, III y IV) (Pick y Raker, 1979; Nelson, 1980; Süß, 1980). En mitocondrias de hígado de rata el sector F0 consta, al menos, de cinco subunidades (Pedersen y Carafoli, 1987a), y de ocho en mitocondrias de corazón bovino (Stiggall y col. 1978). El único polipéptido absolutamente conservado en todos los complejos F0 estudiados hasta la fecha es el proteolípido o proteína de unión a DCCD, representado por la subunidad c de *E.coli*, la subunidad III de cloroplastos y la subunidad 9 del complejo de levaduras y corazón bovino. Este proteolípido es una proteína integral de membrana de 8 kDa.

Estudios de microscopía electrónica han permitido visualizar una estructura del complejo F-ATPasa semejante a la descrita anteriormente para las V-ATPasas, consistente en un dominio globular de 90 Å de diámetro anclado en la membrana a través de un tallo conector de 30 Å de diámetro y 40 Å de longitud (Fig. 1.4). La cristalización del sector F1 ha permitido obtener información sobre la estructura cuaternaria de dicho fragmento hasta una resolución de 3.6 Å mediante el empleo de difracción de rayos X (Bianchet y col. 1991). Este estudio permitió identificar una simetría de orden 3 en el sector F1, estando cada elemento constituido por un dímero $\alpha\beta$. La interacción entre las subunidades α y β parece producirse a través de regiones equivalentes entre ambas subunidades y podría resultar en la formación de un sitio catalítico (Williams y Coleman,

1982) o implicar una interacción de un sitio regulador en la subunidad α con un sitio catalítico en la subunidad β (Verburg y Allison, 1990).

La actividad del complejo ATP-sintasa puede ser inhibida por DCCD, oligomicina, venturicidina, cadmio y agentes mercuriales.

A pesar de las investigaciones exhaustivas que se han efectuado sobre las F-ATPasas, el mecanismo de acción de estas enzimas no ha sido aún resuelto. El sector F1 parece contener al menos tres sitios de unión a ATP de baja afinidad (Cross y Kalin, 1982), localizados en las subunidades β (Khananshivili y Gromet-Elhanan, 1984) o en las interfases α - β (Williams y Coleman, 1982). También se ha descrito la existencia de tres sitios de unión a nucleótidos de alta afinidad (Harris y col. 1977; Harris y col, 1973), que pueden corresponder a sitios reguladores en las subunidades α y β . Sin embargo, el hecho de que análogos fotoactivables de nucleótidos marquen específicamente la subunidad β (Garin y col., 1986) y de que algunas subunidades β aisladas catalicen la hidrólisis de ATP sugiere que los sitios catalíticos se localizan en la subunidad β . En el sector F1 también se encuentran 3 sitios de unión a fosfato inorgánico y al menos un sitio de unión para oxianiones.

La identificación de las regiones aminoacídicas y residuos de la subunidad β del complejo F1-ATPasa implicadas en la unión e hidrólisis de ATP se ha efectuado mediante 2 aproximaciones:

1.- Comparación entre las secuencia de subunidades β de distintos organismos y las de otras proteínas que unen o hidrolizan ATP y cuya estructura terciaria es conocida.

2.- Marcaje covalente de la subunidad β con análogos fotoactivables de nucleótidos de adenina e inhibidores específicos marcados isotópicamente.

Ambas estrategias han permitido identificar una serie de residuos y regiones de la proteína implicados en la unión de nucleótidos de adenina y que se detallan en la figura 1.5.

La identificación de regiones homólogas en las secuencias de β -F1-ATPasa y adenilato quinasa y la existencia en dichas regiones de residuos covalentemente modificables por análogos de ATP permitieron a Duncan y col., (1986) proponer un modelo especulativo de la estructura terciaria del dominio de unión de nucleótidos de la

	1	50	100
Atpb_Bovin	MLGLVGRVVAASASGALRGLSPSAPLPQAQQLLRAPALQPARDYAAQASPSFKAGATTGRIVAVIGAVVDVQFDEGLPPILNALEVQGRETRLVLEVA		
Atpb_Human	MLGFVGRVVAAPASGALRRLTPSASLPQAQQLLRAPTAVHPVRDYAAQTSPSFKAGAATGRIVAVIGAVVDVQFDEGLPPILNALEVQGRETRLVLEVA		
Atpb_Rat	MLSLVGRVASASASGALRGLNPLAALPQABLLRLTAPAGVHPARDYAAQSSAAPKAGTATGQIVAVIGAVVDVQFDEGLPPILNALEVQGRESRLVLEVA		
	101	150	200
Atpb_Bovin	QHLGESTVRTIAMDGTEGLVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAAIHAEAEFVEMSVEQEILVTGIKVVDDLAPYAKGG		
Atpb_Human	QHLGESTVRTIAMDGTEGLVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAPIHAEAEFVEMSVEQEILVTGIKVVDDLAPYAKGG		
Atpb_Rat	QHLGESTVRTIAMDGTEGLVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAPIHAEAEFVEMSVEQEILVTGIKVVDDLAPYAKGG		
	201	250	300
Atpb_Bovin	KIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVINLKDATSKVALVYGQMNPEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQD		
Atpb_Human	KIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVINLKDATSKVALVYGQMNPEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQD		
Atpb_Rat	KIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVINLKDATSKVALVYGQMNPEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQD		
	a	b	c
	301	350	400
Atpb_Bovin	VLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYPOTLATDMGTMQERITTTKSGSITSVQAIYVPADDLTDPAATTFAHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDP		
Atpb_Human	VLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYPOTLATDMGTMQERITTTKSGSITSVQAIYVPADDLTDPAATTFAHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDP		
Atpb_Rat	VLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYPOTLATDMGTMQERITTTKSGSITSVQAIYVPADDLTDPAATTFAHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDP		
	e	f	g
	401	450	500
Atpb_Bovin	LDSTSRIMDPNIVGSEHIDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVSARKIQRFSLQPFQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGFQQILAGEYD		
Atpb_Human	LDSTSRIMDPNIVGSEHIDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVSARKIQRFSLQPFQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGFQQILAGEYD		
Atpb_Rat	LDSTSRIMDPNIVGSEHIDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVSARKIQRFSLQPFQVAEVFTGHLGKLVPLKETIKGFQQILAGEYD		
	i		
	501	529	
Atpb_Bovin	HLPEQAFYMGVPIEEAVAKADKLAEHSS		
Atpb_Human	HLPEQAFYMGVPIEEAVAKADKLAEHSS		
Atpb_Rat	HLPEQAFYMGVPIEEAVAKADKLAEHSS		

Figura 1.5. Localización de las regiones y residuos que se encuentran implicados en la interacción de nucleótidos de adenina en las subunidades β de las ATPasas de tipo F. Estos fueron identificados mediante (i) caracterización de residuos homólogos en otras proteínas que unen ATP y (ii) marcaje covalente con análogos de nucleótidos fotoactivables. Las secuencias que se indican son las descritas por Runswick y Walker, (1983), Ohta y Kagawa (1986) y Garboczi y col., (1989) para las subunidades β del complejo F1-ATPasa de mitocondria de hígado de rata, bovina y humana respectivamente, indicadas en ese orden por su código de acceso en SwissProt. Los residuos implicados en la interacción con ATP se muestran subrayados y en negrita. (a) la región consenso GXXXGKT (X = cualquier aminoácido) conocida genéricamente como P-loop (Saraste y col., 1990) aparece en un gran número de proteínas que unen e hidrolizan ATP (adenilato quinasa, miosina) y GTP (p21ras, factores de elongación); fue identificada en las β -F1-ATPasas mediante comparación de secuencias con otras proteínas que unen ATP (Walker y col., 1982; Saraste y col., 1990, Duncan y col., 1986). Además, el residuo de lisina en posición 155 puede ser marcado covalentemente con Nbf-Cl (Andrews y col., 1984). (b) el residuo de aspártico en posición 181 es modificado covalentemente por DCCD (Yoshida y col., 1982). (c) el residuo de metionina en posición 214 es esencial para la actividad ATPasa, según se ha demostrado mediante estudios de mutagénesis en β -F1-ATPasa de E.coli (Noumi y col., 1984). (d) la región de secuencia RX3G3H4 (X= cualquier residuo, H = aminoácido hidrofóbico) aparece absolutamente conservada en varios enzimas que utilizan ATP (α y β -F1-ATPasas, translocador de nucleótidos de adenina, adenilato quinasa, fosfofructoquinasa) (Walker y col., 1982). (e) la región de torno al residuo de treonina 291 se encuentra absolutamente conservado con respecto a las P-ATPasas (Pedersen y Carafoli, 1987), a excepción del residuo de treonina 291, que en las P-ATPasas aparece como aspártico, siendo éste precisamente el residuo que se fosforila durante el ciclo catalítico. (f) la lisina en posición 294 se marca con 8-azido ATP (Hollemans y col., 1983). (g) la tirosina en posición 304 puede ser covalentemente modificada por Nbf-Cl (Andrews y col., 1984) y 8-azido ATP (Hollemans y col., 1983). (h) La tirosina en posición 338 puede ser covalentemente modificada por 2-azido ATP (Garin y col., 1986) y por FSBI (Bullough y Allison, 1986). (i) La tirosina en posición 361 es marcada por FSBA (Bullough y Allison, 1986).

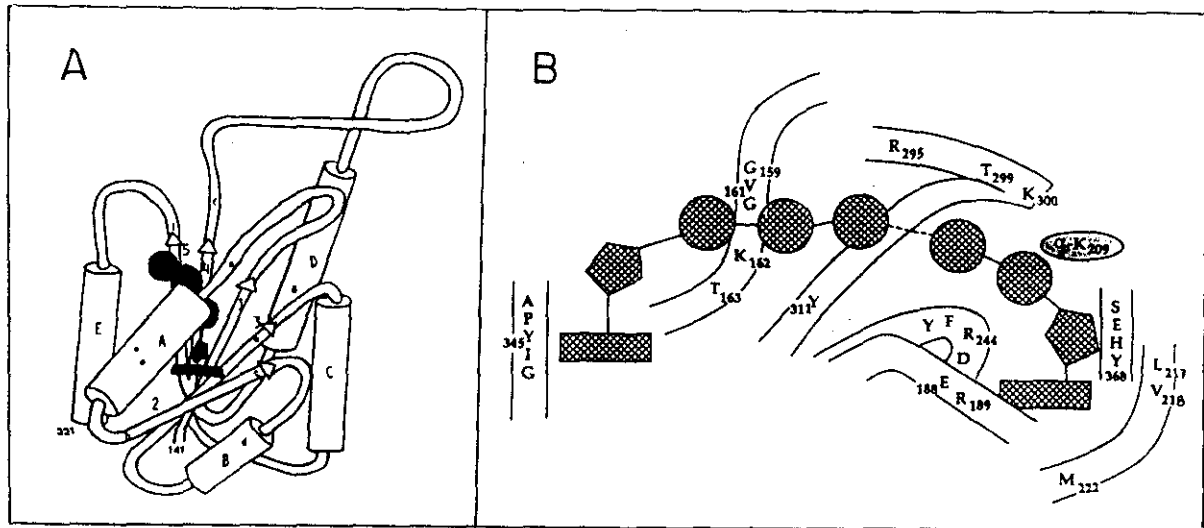


Figura 1.6. Modelos hipotéticos propuestos para la estructura terciaria del dominio de unión de nucleótidos en β -F1-ATPasa.

A- Modelo basado en la homología de secuencia de β -F1-ATPasa y adenilato quinasa y en la predicción de estructura secundaria de la subunidad β (Duncan y col., 1986). La molécula de ATP (fondo oscuro) está colocada en una hipotética hendidura, de forma semejante a como ocurre en la adenilato quinasa.

B- Modelo basado en la semejanza entre la estructura terciaria de la adenilato quinasa y la predicción de estructura secundaria de la β -F1-ATPasa y en los datos obtenidos de experimentos de marcaje por afinidad de la subunidad β con inhibidores específicos y análogos de sustrato. Según Vogel y Cross (1991)

subunidad β de *E.coli*, empleando como base estructural la estructura tridimensional conocida de la adenilato quinasa. Dicho modelo se indica en la figura 1.6A.

Independientemente, Vogel Y Cross (1991) han propuesto otro modelo parcial de la estructura terciaria del sitio de unión de nucleótidos en la subunidad β , basándose principalmente en la similitud existente entre la estructura secundaria teórica de la porción central de la subunidad β y la estructura tridimensional conocida de la adenilato quinasa y en los estudios de marcaje con análogos de nucleótidos e inhibidores. En este modelo (Fig. 1.6B), se propone que los sitios catalíticos de adenilato quinasa y β -F1-ATPas son equivalentes, de forma que los sitios de unión de ATP y AMP en la quinasa son

considerados equivalentes a los sitios catalítico (izquierda en la figura 1.6B) y no catalítico (derecha en figura 1.6B) de unión de nucleótidos, respectivamente, en la subunidad β . En el esquema mostrado en la figura 1.6B, la orientación de todos los residuos hasta Tyr-311 se ha efectuado en base a la estructura tridimensional de adenilato quinasa, mientras que el resto de residuos se han dispuesto de acuerdo con los datos de marcaje por afinidad de la subunidad β . Una explicación detallada del significado funcional de cada residuo mostrado en este modelo (Fig. 1.6B) ha sido proporcionada por Penefsky y Cross (1991).

Las subunidades α también son capaces de unir ATP, lo que origina profundos cambios conformacionales en la proteína (Dunn y col., 1980; Senda y col., 1983).

Se desconoce el mecanismo exacto por el que el flujo de protones a través del complejo F₀F₁ se acopla a la síntesis de ATP. Las evidencias disponibles sugieren que las moléculas de ADP y fosfato se unen a los sitios catalíticos (de baja afinidad) en el complejo F₁ y, mediante el ataque nucleofílico del oxígeno β del ADP a la molécula de fosfato, se produce la síntesis de una molécula de ATP (Cross, 1981). Este proceso parece ocurrir de forma espontánea, ya que se ha demostrado que la variación de energía libre de Gibbs en el proceso de síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato unidos al complejo F₁ es prácticamente nulo (Boyer, 1973). La disociación del ATP del complejo F₁ ocurre a consecuencia de un cambio conformacional en la proteína, originado por el flujo de protones a través del F₀. Uno de los mecanismos hipotéticos para explicar la síntesis de ATP es el conocido como mecanismo "binding change" o modelo rotacional (Boyer, 1979). Este modelo supone que en cada ciclo de reacción, una vez que se ha producido la síntesis espontánea de ATP, el paso de protones a través del complejo provoca una rotación de 120° en la región $\alpha_3\beta_3$, con respecto a la porción $\gamma\delta\epsilon$, de forma que la orientación relativa de la subunidad β con respecto a las subunidades minoritarias del complejo determina un cambio en sus afinidades relativas por ATP y por ADP y fosfato, provocando la liberación del ATP y la unión con nuevas moléculas de ADP y fosfato (Boyer, 1989).

1.4.3. Evolución de las ATPasas translocadoras de iones.

Al igual que ocurre con otras familias proteicas esenciales para la viabilidad celular, las ATPasas presentan un alto grado de conservación evolutiva, probablemente debido a la poca variabilidad estructural impuesta por el requerimiento de una conformación plenamente funcional. El clonaje y secuenciación de cDNAs

correspondientes a las subunidades de las P-, V- y F-ATPasas de diversos organismos ha proporcionado valiosa información sobre las distintas etapas evolutivas de estas proteínas, así como sobre la evolución de los tres grandes reinos de seres vivos (eubacterias, arqueobacterias y eucariotas).

Es lógico suponer que la aparición de la primera célula o progenote separada del medio externo por un sistema de membrana fuera acompañada de la aparición simultánea de una proteína encargada de mantener constante la composición química intracelular a expensas del consumo energético. Esto hace pensar que la aparición de las ATPasas translocadoras de iones fue realmente un evento temprano en la evolución, e incluso se ha sugerido que todas las proteínas que unen y/o hidrolizan ATP provienen de un ancestro común (Pedersen y Carafoli, 1987b; Saraste y col. 1990).

Un examen superficial de las características estructurales y funcionales de las ATPasas de tipo P, V y F indica claramente que las F- y V-ATPasas están más relacionadas entre sí que cualquiera de ellas con las P-ATPasas. La comparación de secuencias de las P-ATPasas con distintas subunidades de las F-ATPasas no revela homologías significativas, a excepción de un octapéptido central que contiene el residuo de Asp fosforilable en las P-ATPasas y que se encuentra absolutamente conservado en las subunidades β de las F-ATPasas a excepción del Asp fosforilable que está sustituido por una treonina (Garboczi y col. 1988). Sin embargo, la sustitución del residuo de Thr por Asp en la subunidad β de *E.coli* no confiere a ésta sensibilidad a vanadato, ni promueve la formación de un intermedio fosforilado (Noumi y col. 1988).

El clonaje y secuenciación de los genes codificantes para las distintas subunidades de las ATPasas de tipo F y V ha permitido observar la existencia de homologías significativas entre las subunidades A y B de las V-ATPasas y las subunidades β y α de las F-ATPasas, respectivamente, llegándose a sugerir que estas cuatro proteínas derivan de un único gen ancestral. La posterior secuenciación de los genes codificantes para las subunidades mayoritarias (α y β) de la ATPasa de la arqueobacteria acidotermofílica *Sulfolobus acidocalcarium* mostró una alta homología de secuencia con las subunidades A y B, respectivamente, de las ATPasas de tipo V (Südhof y col., 1989; Gogarten y col., 1989).

La comparación detallada de las distintas secuencias muestra una mayor proximidad por un lado entre las subunidades A de las V-ATPasas y las β de las F-ATPasas. La diferencia de tamaño entre las subunidades β de las ATPasas de tipo F y las A de las ATPasas de tipo V (aproximadamente 20 kDa) radica en la presencia en estas

últimas de una inserción N-terminal de 150 aminoácidos de función desconocida. La introducción de esta inserción permite alinear ambas familias con un 62% de residuos idénticos. Por el contrario, el alineamiento de secuencias correspondientes a las subunidades α de las F-ATPasas y B de V-ATPasas permite encontrar un 25% de residuos idénticos.

Esta relación de similitudes de secuencia ha permitido a Nelson (1992a y b) proponer un modelo para explicar la evolución molecular de las ATPasas de tipo V y F (Fig. 1.7A). Según este, la ATPasa ancestral tendría una estructura hexamérica resultante de la expresión de un único gen. Este gen sufriría una duplicación dando lugar a dos genes que evolucionarían por separado, dando lugar por un lado a las subunidades catalíticas (β -F1 y A-V), y por otro a las reguladoras α -F1 y B-V). La posterior especialización de las subunidades catalíticas y reguladoras para dar lugar a las ATPasas de tipo V y F se originó con la incorporación a los complejos de otras subunidades (C, D y E en V-ATPasas y γ , δ y ϵ en F-ATPasas) que presentan nula homología entre sí y con otros componentes del complejo (Nelson y col. 1990).

El sector de membrana de las proton-ATPasas probablemente sufrió un proceso evolutivo separado. Como marcador de dicho proceso se ha estudiado el proteolípido o proteína de unión a DCCD, que aparece en el sector F0 de las F-ATPasas y en el sector V0 de las V-ATPasas de arqueobacterias (Denda y col. 1990) como un polipéptido de 8 kDa mientras que el sector V0 de las V-ATPasas de eucariotas presenta una masa molecular de 16 kDa (Mandel y col. 1988). El curso de acontecimientos que condujeron a la distribución actual del proteolípido han sido propuestos por Nelson (1992a y b). Según este autor, el gen del proteolípido ancestral era semejante al que actualmente codifica para el proteolípido de las F-ATPasas. Este gen sufrió una duplicación y fusión para dar lugar al gen que codifica para el proteolípido presente en las V-ATPasas de eucariotas. El correspondiente gen de arqueobacterias aparentemente se separó del gen ancestral antes de la duplicación (Nelson, 1992) (Fig. 1.7B). Se desconocen las características de la ATPasa ancestral, pero dada la mayor sensibilidad al O₂ de las V-ATPasas, se piensa que el sector catalítico de las V-ATPasas precedió al de las F-ATPasas, y que este evolucionó a partir del primero mediante la pérdida de un fragmento N-terminal de 120 amino ácidos y la sustitución de los residuos de cisteína por otros menos sensibles al oxígeno. La más probable fuerza selectiva para esta evolución fue la transición de la atmosfera primitiva desde un ambiente altamente reductor a un entorno oxidativo a consecuencia de la aparición de los primeros organismos fotosintéticos generadores de O₂.

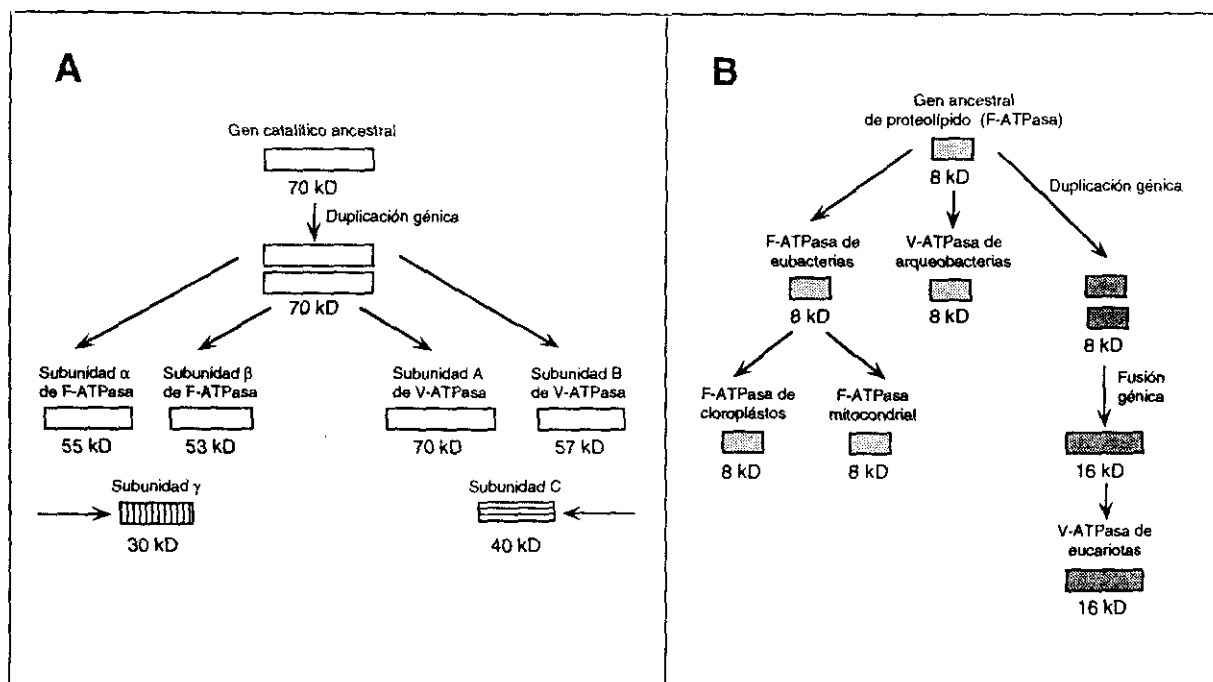


Figura 1.7. Modelo para explicar el origen evolutivo de los distintos componentes de las H^+ -ATPasas, deducidos a partir de comparación de secuencias entre las subunidades homólogas de los distintos tipos de ATPasas. (A) Evolución divergente de los genes codificantes para las subunidades catalíticas y reguladoras de las V- y F-ATPasas mediante procesos de duplicación génica. (B) Evolución del proteolípido de las V-ATPasas de eucariotes y arqueobacterias y de las F-ATPasas. Según Nelson y col. (1992)

El examen detallado de las secuencias de las subunidades A y B de las ATPasas de tipo V y de las subunidades α y β de las de tipo F muestra la conservación de residuos importantes para la actividad biológica. Así, el motivo P-loop consenso de unión a nucleótidos (GX4GKT) y la región EYFRD se encuentran absolutamente conservados entre las subunidades β de las F-ATPasas y las A de las V-ATPasas. El residuo de tirosina en la posición 297 en la subunidad β de *E.coli*, implicado en la unión a NBD-Cl aparece en las subunidades A de las V-ATPasas como una serina, por lo que la inhibición de la actividad ATPasa de las V-ATPasas por NBD-Cl puede ser debida a una interacción de los grupos sulfhidrilo de este agente químico con residuos de cisteína próximos al sitio de unión de ATP (Zimniak y col. 1988; Moriyama y Nelson, 1987).

La comparación de las estructuras, funciones y mecanismo de acción de las ATPasas de tipo F y V de bacterias y orgánulos de distintos organismos ha proporcionado valiosa información sobre el posible origen evolutivo de la célula eucariota. En concreto, el supuesto origen endosimbionte de mitocondrias y cloroplastos y el origen del sistema de endomembrana de las células eucariotas han sido reconsiderados en base a los resultados obtenidos a partir de este tipo de análisis comparativo de secuencias.

1.4.3.1. *Hipótesis endosimbionte.*

El origen de mitocondrias y cloroplastos a partir del establecimiento de una relación de endosimbiosis entre una forma primitiva de eubacteria y el protoeucariote fue propuesto inicialmente en base a las numerosas semejanzas existentes entre eubacterias, cloroplastos y mitocondrias (secuencias de rRNA, maquinaria de transcripción y traducción). Estas semejanzas se extienden también a la estructura y mecanismo de acción de las F-ATPasas de eubacterias y orgánulos eucariotas. Así, la estructura de las F-ATPasas es muy similar en todos los organismos estudiados y su función y mecanismo de acción resulta tan conservada que permite el intercambio de subunidades entre los complejos de distintos organismos sin pérdida de la funcionalidad (Richter y col. 1986; Futai y col. 1980; Takeda y col. 1982; Hsu y col. 1984).

Se ha sugerido que los cloroplastos proceden evolutivamente de bacterias similares a las actuales cianobacterias (Thorne, 1977; Gray y Doolittle, 1982; Wallace, 1982; Gray y col., 1984) y que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias rojas fotosintéticas semejantes a las bacterias rojas del tipo *Rhodospirillum rubrum* (Dickerson, 1980; Woese, 1980; Yang, 1985). Esta hipótesis, inicialmente propuesta en base a la comparación de secuencias de los RNAs 16S de distintos organismos, se ha visto reforzada al estudiar la organización de los genes que codifican para las distintas subunidades del complejo F-ATPasa. Así, en cianobacterias, los componentes del complejo F₀F₁-ATP sintasa están codificados en dos operones, el *atp1* que contiene los genes que codifican para la proteína I y las subunidades a, c, b', b, γ , α y δ , y el *atp2* que contiene los genes de las subunidades β y ϵ . El genoma de cloroplastos de células superiores presenta una distribución semejante con la excepción de las subunidades b' (equivalente a la subunidad II), γ y δ , que están codificadas en el genoma nuclear. De esta forma, aparecen dos unidades transcripcionales codificantes para las subunidades IV (a), III (c), I (b), γ y α por un lado, y β y ϵ por otro. La identificación en organismos actuales de pasos intermedios en la evolución podría ayudar a confirmar esta hipótesis. Así, por

ejemplo, se ha demostrado que la subunidad δ del complejo F-ATPasa está codificada por el genoma del cloroplasto en *Odontella sinensis* (Pancic y col. 1991).

Los genes que codifican para las subunidades del complejo F₀F₁-ATP sintasa en *R. rubrum* están organizados en dos operones, uno de ellos (atp1) que codifica para las subunidades del sector F₀ (a, c, b' y b) y otro (atp2) codificante para las subunidades del sector F₁ (δ , α , γ , β y ϵ). El genoma mitocondrial en mamíferos y levaduras contiene únicamente algunos de los genes que codifican para componentes del sector F₀. Así, en levadura el genoma mitocondrial codifica para la subunidad 9 (proteolípido), subunidad 8 y subunidad 6, mientras que en mamíferos solo son codificados en el genoma mitocondrial las subunidades 6 y 8. Esto puede explicarse suponiendo que el operon atp2 fue transferido al núcleo como una unidad. Sin embargo, el genoma mitocondrial de plantas codifica para la subunidad α (Braun y Levings, 1985), lo que puede ser simplemente un reflejo de un paso intermedio de la evolución o bien el resultado de que este gen fuera reintroducido en el genoma mitocondrial, hipótesis plausible dada la alta capacidad de recombinación del genoma mitocondrial en plantas (Attardi y Schatz, 1988).

El gen codificante para el proteolípido del sector F₀ se localiza en el núcleo de las células de mamíferos (Mahlke y col. 1990) y de *N. crassa* (Viebrock y col. 1982). Sin embargo, el genoma mitocondrial de *N. crassa* contiene un gen potencialmente capaz de codificar para el proteolípido (subunidad 9), pero que no es transcripcionalmente activo (van den Boogart y col. 1982), lo que puede representar un paso evolutivo intermedio.

En conclusión, la hipótesis del origen endosimbionte de mitocondrias y cloroplastos se ve apoyada por las semejanzas estructurales y funcionales existentes entre las ATPasas de tipo F de orgánulos y de eubacterias actuales. En cualquier caso, existe un acuerdo general sobre la secuencia de procesos que siguieron al establecimiento de la relación de endosimbiosis. Estos fueron: (i) la pérdida de rutas metabólicas comunes y el consiguiente desarrollo de transportadores para los metabolitos esenciales aportados por el hospedador, (ii) transferencia de genes desde el genoma del orgánulo al núcleo y desaparición de genes redundantes y (iii) desarrollo de un mecanismo específico para el transporte de proteínas al interior del orgánulo.

1.4.3.2. Desarrollo del sistema de endomembrana en células eucariotas.

El citoplasma de las células eucariotas contiene una gran variedad de estructuras delimitadas por membranas biológicas. Entre estas se incluyen los orgánulos con función metabólica (mitocondrias, cloroplastos, microcuerpos) y el denominado sistema de

citomembrana o vacuolar, que comprende el retículo endoplásmico liso y rugoso, el complejo de Golgi, gránulos de secreción, endosomas, lisosomas, vesículas de almacenamiento y transporte, vacuolas y elementos de la membrana nuclear. Todas estas estructuras se consideran incluidas en un único sistema en base a su capacidad para establecer conexiones directas o indirectas entre sí o con la membrana plasmática mediante procesos de fusión/fisión. Este sistema de citomembrana constituye, junto con la membrana plasmática, un orgánulo complejo, implicado principalmente en procesos de intercambio entre la célula y su entorno.

El origen evolutivo del sistema de citomembrana de las células eucariotas ha sido muy debatido, dado que sus ancestros evolutivos, las células procariotas, carecen por completo de este tipo de estructuras. Se ha sugerido que este sistema tiene su origen en una membrana plasmática ancestral de tipo procariote, que a través de sucesivos procesos de expansión, invaginación, vesiculación y diferenciación, dieron lugar a un sistema de citomembrana como el que conocemos hoy en día (Lee y Hong., 1987; Cavalier-Smith, 1987; Zillig, 1987; Jones y col., 1987). Una fuerte evidencia a favor de esta hipótesis lo constituye el hecho de que algunas de las funciones desempeñadas por los distintos integrantes del sistema de citomembrana, son realizadas por los organismos procariotes en la proximidad de la membrana plasmática. Ejemplos de este tipo de funciones son el transporte molecular e iónico, la translocación de proteínas y glicósidos, el ensamblaje de lípidos, el anclaje del cromosoma durante la replicación del DNA (ver de Duve, 1990 para una discusión exhaustiva sobre el tema).

La existencia de ciertas homologías entre las arqueobacterias y las células eucariotas (ambos tipos de células emplean opsinas como pigmentos fotoactivables, usan dolicolfosfato como transportador de restos glicosilo, contienen genes interrumpidos por intrones, presentan características comunes en su maquinaria traduccional, y las arqueobacterias tienen proteínas semejantes a la actina y a las histonas) ha permitido sugerir que las células eucariotas están más cercanas evolutivamente a las arqueobacterias que a las eubacterias (Fox y col. 1980; Kaine y col. 1983; Daniels y col. 1985). La presencia exclusiva de ATPasas de tipo V tanto en el sistema de citomembrana de eucariotas como en la membrana plasmática de las arqueobacterias, refuerza la hipótesis de que la célula eucariota procede evolutivamente de las arqueobacterias, a la vez que proporciona una evidencia adicional a favor del hipotético origen del sistema de citomembrana de las células eucariotas a través de la diferenciación e internalización de la membrana plasmática de sus ancestros evolutivos.

La cuestión que se plantea inmediatamente es por que las arqueobacterias han mantenido las V-ATPasas como enzimas encargada de la síntesis de ATP, mientras que en las células eucariotas, la V-ATPasas funcionan exclusivamente n sentido contrario. Los estudios con *Sulfolobus acidocalcarium* han permitido proponer una solución parcial; las V-ATPasas son las únicas ATPasas compatibles con la vida en condiciones tan extremas. *S. acidocalcarium* habita en ambientes con pH próximos a 2 y debe bombear protones contra gradientes de 4 unidades de pH, por lo que una ATPasa con una estequiometría de tres protones por cada molécula de ATP sólo podría funcionar a un pH extracelular igual o inferior a 3 trabajando próximo al equilibrio termodinámico. Por el contrario, las V-ATPasas, cuya estequiometría protón/ATP es de 2, pueden generar un gradiente de 4 unidades de pH y por tanto vivir a pH 2.

La presencia de V-ATPasas en el sistema vacuolar de células eucariotas se ha interpretado no sólo como la consecuencia lógica de la proximidad evolutiva entre arqueobacterias y eucariotas, sino como un mecanismo de seguridad para impedir la acidificación excesiva de los compartimentos intracelulares. La principal característica diferenciadora de las V-ATPasas de arqueobacterias y eucariotas es la presencia en estas últimas de un proteolípido de 16 kDa, resultante de la duplicación del gen que codifica para el proteolípido de 8 kDa presente en aquellas (Fig. 1.7B). La permeabilidad del sector V0 se ha correlacionado con la presencia del proteolípido, de forma que el proteolípido de 16 kDa presenta una permeabilidad pasiva a protones superior a la del proteolípido de 8 kDa, originando así una V-ATPasa menos eficaz, que sólo puede funcionar unidireccionalmente en la hidrólisis de ATP para generar un gradiente de protones. Además la existencia de isoformas para las distintas subunidades de las V-ATPasas confiere a estas una diversificación funcional que las permite desempeñar papeles específicos y especializados en los distintos orgánulos donde se encuentra.

Se puede considerar por tanto, que las proton-ATPasas están desempeñando y, muy probablemente, van a desempeñar en el futuro un importante papel a la hora de establecer las relaciones evolutivas entre las distintas familias de organismos. El clonaje y secuenciación de genes codificantes para las subunidades de las proton-ATPasas de otros organismos contribuirá sin duda a descifrar los complejos mecanismos responsables de la diversificación celular y de la generación del amplio espectro de organismos existentes en la actualidad.

1.5. BIBLIOGRAFIA

- Accili, D., Kadowaki, T., Kadowaki, H., Mosthaf, L., Ullrich, A. y Taylor, S.I. (1992) "Immunoglobulin heavy chain-binding protein binds to misfolded mutant insulin receptors with mutations in the extracellular domain" *J.Biol.Chem.* **267**:586-590.
- Al Awqati, Q. (1986) "Proton-translocating ATPases" *Annu.Rev.Cell Biol.* **2**:179-99.
- Allison, D.S. y Schatz, G. (1986) "Artificial mitochondrial presequences" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**:9011-9015.
- Amir-Shapira, D., Leustek, T., Dalie, B., Weissbach, H. y Brot, N. (1990) "Hsp70 proteins, similar to *Escherichia coli* DnaK, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis*" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:1749-1752.
- Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1983) "Proton ATPases: Structure and mechanism" *Annu.Rev.Biochem.* **52**:801-824.
- Ananthan, J., Goldberg, A.L. y Voellmy, R. (1986) "Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes" *Science* **232**:522-524.
- Anderson, C.M., Stenkamp, R.E. y Steitz, T.A. (1978) "Sequencing a protein by x-ray crystallography. II. Refinement of yeast hexokinase B co-ordinates and sequence at 2.1 Å resolution" *J.Mol.Biol.* **123**:15-33.
- Anderson, R. y Hahn, G.M. (1985) "Differential effects of hyperthermia on the Na⁺-K⁺-ATPase of Chinese hamster ovary cells" *Radiat.Res.* **102**:314-323.
- Anderson, R.L. y Parker, R. (1982) "Analysis of membrane lipid composition of mammalian cells during the development of thermotolerance" *Int.J.Radiat.Biol.Relat.Stud.Phys.Chem Med.* **42**:57-69.
- Andrews, W.W., Hill, F.C. y Allison, W.S. (1984) "Identification of the essential tyrosine residue in the β subunit of bovine heart mitochondrial F₁-ATPase that is modified by 7-chloro-4-nitro[14C]benzofurazano" *J.Biol.Chem.* **259**:8219-8225.
- Ang, D., Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M. y Georgopoulos, C. (1991) "Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins" *J.Biol.Chem.* **266**:24233-24236.
- Argan, C., Lusty, C.J. y Shore, G.C. (1983) "Membrane and cytosolic components affecting transport of the precursor for ornithine carbamyltransferase into mitochondria" *J.Biol.Chem.* **258**:6667-6670.
- Arrigo, A.P., Fakan, S. y Tissieres, A. (1980) "Localization of the heat shock-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells" *Dev.Biol.* **78**:86-103.
- Ashburner, M. y Bonner, J.J. (1979) "The induction of gene activity in *Drosophila* by heat-shock" *Cell* **17**:241-254.
- Atencio, D.P. y Yaffe, M.P. (1992) "MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import" *Mol.Cell.Biol.* **12**:283-291.
- Attardi, G. y Schatz, G. (1988) "Biogenesis of mitochondria" *Annu.Rev.Cell Biol.* **4**:289-333.
- Avital, S. y Gromet-Elhanan, Z. (1991) "Extraction and purification of the β -subunit and an active $\alpha\beta$ -core complex from the spinach chloroplast CF₀F₁-ATP synthase" *J.Biol.Chem.* **266**:7067-7072.
- Avni, A., Avital, S. y Gromet-Elhanan, Z. (1991) "Reactivation of the chloroplast CF₁-ATPase β subunit by trace amounts of the CF₁ α subunit suggests a chaperonin-like activity for CF₁ α " *J.Biol.Chem.* **266**:7317-7320.
- Baker, A. y Schatz, G. (1987) "Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**:3117-3121.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. y Schatz, G. (1990) "A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability" *Nature* **348**:605-609.
- Baker, K.P. y Schatz, G. (1991) "Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria" *Nature* **349**:205-208.
- Banroques, J., Perea, J. y Jacq, C. (1987) "Efficient splicing of two yeast mitochondrial introns controlled by a nuclear-encoded maturase" *EMBO J.* **6**:1085-1091.

- Bardwell, J.C. y Craig, E.A. (1984) "Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**:848-852.
- Bardwell, J.C. y Craig, E.A. (1987) "Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**:5177-5181.
- Barracclough, R. y Ellis, R.J. (1980) "Protein synthesis in chloroplasts. IX: Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts" *Biochim.Biophys.Acta* **608**:19-31.
- Beckmann, R.P., Mizzen, L.A. y Welch, W.J. (1990) "Interaction of Hsp 70 with Newly synthesized Proteins: Implications for protein folding and Assembly" *Science* **248**:850-854.
- Bedwell, D.M., Strobel, S.A., Yun, K., Jongeward, G.D. y Emr, S.D. (1989) "Sequence and structural requirements of a mitochondrial protein import signal defined by saturation cassette mutagenesis" *Mol.Cell.Biol.* **9**:1014-1025.
- Beers, M.F., Carty, S.E., Johnson, R.G. y Scarpa, A. (1982) " H^{+} -ATPase and catecholamine transport in chromaffin granules" *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **402**:116-33.
- Beltrán, C., Kopecky, J., Pan, Y.C., Nelson, H. y Nelson, N. (1992) "Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H^{+} -ATPase" *J.Biol.Chem.* **267**:774-779.
- Beltrán, C. y Nelson, N. (1992) "The membrane sector of vacuolar H^{+} -ATPase by itself is impermeable to protons" *Acta Physiol.Scand.* (en prens)
- Benaïm, G., Clark, A. y Carafoli, E. (1986) "ATPase activity and Ca^{2+} transport by reconstituted tryptic fragments of the Ca^{2+} pump of the erythrocyte plasma membrane" *Cell Calcium* **7**:175-186.
- Bianchet, M., Ysern, X., Hüllihen, J., Pedersen, P.L. y Amzel, L.M. (1991) "Mitochondrial ATP synthase. Quaternary analysis of the F_1 moiety at 3.6 Å determined by X-ray diffraction analysis" *J.Biol.Chem.* **266**:21197-21210.
- Bibus, C.R., Lemire, B.D., Suda, K. y Schatz, G. (1988) "Mutations restoring import of a yeast mitochondrial protein with a nonfunctional presequence" *J.Biol.Chem.* **263**:13097-13102.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. (1987) "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2" *Nature* **329**:506-512.
- Blackman, R.K. y Meselson, M. (1986) "Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* hsp82 gene" *J.Mol.Biol.* **188**:499-515.
- Bloemendal, H., Berns, T., Zweers, A., Hoenders, H. y Benedetti, E.L. (1972) "The state of aggregation of -crystallin detected after large-scale preparation by zonal centrifugation" *Eur.J.Biochem.* **24**:401-406.
- Blumberg, H. y Silver, P.A. (1991) "A homologue of the bacterial heat-shock gene *DnaJ* that alters protein sorting in yeast" *Nature* **349**:627-630.
- Bockhareva, E.S., Lissin, N.M., Flynn, G.C., Rothman, J.E. y Girshovich, A.S. (1992) "Positive cooperativity in the functioning of molecular chaperone GroEL" *J.Biol.Chem.* **267**:6796-6800.
- Bochkareva, E.S., Lissin, N.M. y Girshovich, A.S. (1988) "Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL proteins" *Nature* **336**:254-257.
- Bole, D.G., Hendershot, L.M. y Kearney, J.F. (1986) "Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas" *J.Cell Biol.* **102**:1558-1566.
- Bowman, B.J., Dschida, W.J., Harris, T. y Bowman, E.J. (1989) "The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* contains an F_1 -like structure" *J.Biol.Chem.* **264**:15606-15612.
- Boyer, P.D. (1979) "The binding-change mechanism of ATP synthesis". En: "Membrane bioenergetics" pp 461-479 (Lee, C.P., Schatz, G. y Ernster, L. eds.) Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
- Boyer, P.D. (1989) "A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis" *FASEB J.* **3**:2164-2178.
- Boyer, P.D., Cross, R.L. y Momsen, W. (1973) "A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reaction" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **70**:2837-2839.

- Brandsch, R., Bichler, V., Schmidt, M. y Buchner, J. (1992) "GroE dependence of refolding and holoenzyme formation of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase" *J.Biol.Chem.* **267**:20844-20849.
- Braun, C.J. y Levings, C.S.III. (1985) "Nucleotide sequence of the F1-ATPase α subunit gene from maize mitochondria" *Plant Physiol.* **79**:571-577.
- Breen, G.A.M. (1986) "Bovine liver cDNA clones encoding a precursor of the α -subunit of the mitochondrial ATP synthase complex" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **152**:264-269.
- Brugge, J.S. (1986) "Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90" *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **123**:1-22.
- Brugge, J.S., Erikson, E. y Erikson, R.L. (1981) "The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins" *Cell* **25**:363-72.
- Buchmeier, N.A. y Heffron, F. (1990) "Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages" *Science* **248**:730-732.
- Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F.X. y Kiefhaber, T. (1991) "GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation" *Biochemistry* **30**:1586-1591.
- Buffa, P., Guarriera Bobyleva, V., Muscatello, U. y Pasquali Ronchetti, I. (1970) "Conformational changes of mitochondria associated with uncoupling of oxidative phosphorylation in vivo and in vitro" *Nature* **226**:272-274.
- Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986) "Inactivation of the bovine heart mitochondrial F1-ATPase by 5'-p-fluorosulfonyl[3H]inosine is accompanied by modification of tyrosine 345 in a single β subunit" *J.Biol.Chem.* **261**:14171-14177.
- Bullough, D.A. y Allison, W.S. (1986) "Three copies of the β subunit must be modified to achieve complete inactivation of the bovine mitochondrial F1-ATPase by 5'-p-fluorobenzoyl adenosine" *J.Biol.Chem.* **261**:5722-5730.
- Burdon, R.H. y Cutmore, M.M. (1982) "Human heat shock gene expression and the modulation of plasma membrane Na⁺-K⁺ ATPase activity" *FEBS Lett.* **140**:45-48.
- Calderwood, S.K. y Hahn, G.M. (1983) "Thermal sensitivity and resistance of insulin-receptor binding" *Biochim.Biophys.Acta* **756**:1-8.
- Caplan, A.J. y Douglas, M.G. (1991) "Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein" *J.Cell Biol.* **114**:609-621.
- Carlino, A., Toledo, H., Skaleris, D., DeLisio, R., Weissbach, H. y Brot, N. (1992) "Interactions of liver GRP78 and escherichia coli recombinant GRP78 with ATP: multiple species and disaggregation" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:2081-2085.
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R. y Welch, W.J. (1985) "The common 90 kD protein component of non-transformed "8S" steroid receptors is a heat shock protein" *EMBO J.* **4**:3131-3137.
- Catelli, M.G., Radanyi, C., Renoir, J., Binart, N. y Baulieu, E.E. (1988) "Definition of domain of hsp90 interacting with steroid receptors" *J.Cell.Biochem. Suppl.* **12D**:276.
- Cavalier Smith, T. (1987) "The origin of eukaryotic and archaebacterial cells" *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **503**:17-54.
- Cegielska, A. y Georgopoulos, C. (1989) "Functional domains of the Escherichia coli dnaK heat shock protein as revealed by mutational analysis" *J.Biol.Chem.* **264**:21122-21130.
- Chandrasekar, G.N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R. y Georgopoulos, C. (1986) "Purification and properties of the groES morphogenetic protein of Escherichia coli" *J.Biol.Chem.* **261**:12414-12419.
- Chappell, T.G., Konforti, B.B., Schmid, S.L. y Rothman, J.E. (1987) "The ATPase Core of Clathrin Uncoating Protein" *J.Biol.Chem.* **262**:746-751.
- Chappell, T.G., Welch, W.J., Schlossman, D.M., Palter, K.B., Schlesinger, M.J. y Rothman, J.E. (1986) "Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins" *Cell* **45**:3-13.
- Chen, W.J. y Douglas, M.G. (1987) "The role of protein structure in the mitochondrial import pathway. Unfolding of mitochondrially bound precursors is required for membrane translocation" *J.Biol.Chem.* **262**:15605-15609.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U. y Horwich, A.L. (1990) "The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly" *Nature* **348**:455-458.

- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L. y Horwich, A.L. (1989) "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria" *Nature* **337**:620-625.
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P. y Dice, J.F. (1989) "A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins" *Science* **246**:382-385.
- Chirico, W.J., Waters, G. y Blobel, G. (1988) "70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes" *Nature* **332**:805-810.
- Christiansen, E.N. y Kuamma, E. (1969) "Effects of thermal treatment on mitochondria, brain, liver and ascites cells" *Acta Physiol.Scand.* **76**:472-484.
- Clarke, C.F., Cheng, K., Frey, A.B., Stein, R., Hinds, P.W. y Levine, A.J. (1988) "Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and *Escherichia coli* heat shock proteins: in vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP" *Mol.Cell.Biol.* **8**:1206-1215.
- Conlin, C.A. y Miller, C.G. (1992) "Cloning and nucleotide sequence of opdA, the gene encoding oligopeptidase A in *Salmonella typhimurium*" *J.Bacteriol.* **174**:1631-1640.
- Connolly, T. y Gilmore, R. (1989) "The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide" *Cell* **57**:599-610.
- Copeland, C.S., Doms, R.W., Bolzau, E.M., Webster, R.G. y Helenius, A. (1986) "Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport" *J.Cell Biol.* **103**:1179-1191.
- Craig, E.A. (1985) "The heat-shock response" *CRC Crit.Rev.Biochem.* **18**:239-280.
- Craig, E.A. y Gross, C.A. (1991) "Is hsp70 the cellular thermometer?" *Trends Biochem.Sci.* **16**:135-140.
- Craig, E.A., Kramer, J. y Kosic Smithers, J. (1987) "SSC1, a member of the 70-kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**:4156-4160.
- Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Washburne, M.W., Holmes, S., Smithers, J.K. y Nicolet, C.M. (1989) "SSC1, an Essential member of the Yeast HSP70 Multigene Family, Encodes a Mitochondrial Protein" *Mol.Cell.Biol.* **9**:3000-3008.
- Creighton, T.E. (1990) "Protein folding" *Biochem.J.* **270**:1-16.
- Cress, A.E., Culver, P.S., Moon, T.E. y Gerner, E.W. (1982) "Correlation between amounts of cellular membrane components and sensitivity to hyperthermia in a variety of mammalian cell lines in culture" *Cancer Res.* **42**:1716-1721.
- Crooke, E. y Wickner, W. (1987) "Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**:5216-5220.
- Cross, R.L. (1981) "The mechanism and regulation of ATP synthesis by F1-ATPases" *Annu.Rev.Biochem.* **50**:681-714.
- Cross, R.L. y Nalin, C.M. (1982) "Adenine nucleotide binding sites on beef heart F1-ATPase. Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites" *J.Biol.Chem.* **257**:2874-81.
- Csermely, P. y Kahn, C.R. (1991) "The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity" *J.Biol.Chem.* **266**:4943-4950.
- Cyr, D.M. y Douglas, M.G. (1991) "Early events in the transport of proteins into mitochondria. Import competition by a mitochondrial presequence" *J.Biol.Chem.* **266**:21700-21708.
- Cyr, D.M., Lu, X. y Douglas, M.G. (1992) "Regulation of hsp70 function by a eukaryotic dnaJ homolog" *J.Biol.Chem.* **267**:20927-20931.
- Dalman, F.C., Bresnick, E.H., Patel, P.D., Perdew, G.H., Watson, S.J.J. y Pratt, W.B. (1989) "Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of receptor translation in vitro" *J.Biol.Chem.* **264**:19815-19821.
- Dame, J.B. y Scarborough, G.A. (1981) "Identification of the phosphorylated intermediate of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase as β -aspartyl phosphate" *J.Biol.Chem.* **256**:10724-10730.

- Daniels, C.J., Gupta, R. y Doolittle, W.F. (1985) "Transcription and excision of a large intron in the *tRNA^{Trp}* gene of an archaebacterium, *Halobacterium volcanii*" *J.Biol.Chem.* **260**:3132-3134.
- del Valle, R., Soto, U., Necochea, C. y Leighton, F. (1988) "Detection of an ATPase activity in rat liver peroxisomes" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **156**:1353-1359.
- DeLuca Flaherty, C., McKay, D.B., Parham, P. y Hill, B.L. (1990) "Uncoating protein (*hsc70*) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis" *Cell* **62**:875-887.
- Denda, K., Konishi, J., Hajiro, K., Oshima, T., Date, T. y Yoshida, M. (1990) "Structure of an ATPase operon of an acidothermophilic archaebacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*" *J.Biol.Chem.* **265**:21509-21513.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Washburne, M.W., Craig, E.A. y Schekman, R. (1988) "A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides" *Nature* **332**:800-805.
- Dickerson, R.E. (1980) "Evolution and gene transfer in purple photosynthetic bacteria" *Nature* **283**:210-212.
- Dilworth, S.M. y Dingwall, C. (1988) "Chromatin assembly in vitro and in vivo" *Bioessays* **9**:44-49.
- Dorner, A.J., Bole, D.G. y Kaufman, R.J. (1987) "The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins" *J.Cell Biol.* **105**:2665-2674.
- Douma, A.C., Veenhuis, M., Waterham, H.R. y harder, W. (1990) "Immunocytochemical determination of the peroxisomal ATPase of yeasts" *Yeast* **6**:45-51.
- Drummond, I.A., McClure, S.A., Poenie, M., Tsien, R.Y. y Steinhardt, R.A. (1986) "Large changes in intracellular pH and calcium observed during heat shock are not responsible for the induction of heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*" *Mol.Cell.Biol.* **6**:1767-1775.
- Dschida, W.J. y Bowman, B.J. (1992) "Structure of the vacuolar ATPase from *Neurospora crassa* as determined by electron microscopy" *J.Biol.Chem.* **267**:18783-18789.
- Duncan, T.M., Parsonage, D. y Senior, A.E. (1986) "Structure of the nucleotide-binding domain in the β -subunit of *Escherichia coli* F1-ATPase" *FEBS Lett.* **208**:1-6.
- Dunn, S.D. (1980) "ATP causes a large change in the conformation of the isolated a subunit of *Escherichia coli* F1 ATPase" *J.Biol.Chem.* **255**:11857-11860.
- Dupont, Y. (1976) "Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **71**:544-546.
- Earnshaw, W.C., Honda, B.M., Laskey, R.A. y Thomas, J.O. (1980) "Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X.laevis* nucleoplasmin" *Cell* **21**:373-383.
- Edington, B.V., Whelan, S.A. y Hightower, L.E. (1989) "Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction" *J.Cell Physiol.* **139**:219-228.
- Eilers, M. y Schatz, G. (1986) "Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria" *Nature* **322**:228-232.
- Ellis, R.J. (1979) "The most abundant protein in the world" *Trends Biochem.Sci.* **4**:241-244.
- Ellis, R.J. (1987) "Proteins as molecular chaperones" *Nature* **328**:378-379.
- Ellis, R.J. (1990) "The molecular chaperone concept" *Sem.Cell Biol.* **1**:1-9.
- Ellis, R.J. y van der Vies, S.M. (1991) "Molecular chaperones" *Annu.Rev.Biochem.* **60**:321-347.
- Emr, S.D., Vassarotti, A., Garrett, J., Geller, B.L., Takeda, M. y Douglas, M.G. (1986) "The amino terminus of the yeast F1-ATPase β -subunit precursor functions as a mitochondrial import signal" *J.Cell Biol.* **102**:523-533.
- Engman, D.M., Kirchhoff, L.V. y Donelson, J.E. (1989) "Molecular cloning of *mtp70*, a mitochondrial member of the *hsp70* family" *Mol.Cell.Biol.* **9**:5163-5168.
- Escribano, J. y Rozengurt, E. (1988) "Cyclic AMP increasing agents rapidly stimulate vimentin phosphorylation in quiescent cultures of Swiss 3T3 cells" *J.Cell Physiol.* **137**:223-234.

- Fayet, O., Louarn, J.M. y Georgopoulos, C. (1986) "Suppression of the *Escherichia coli* *dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes" *Mol.Gen.Genet.* **202**:435-445.
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T. y Georgopoulos, C. (1989) "The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures" *J.Bacteriol.* **171**:1379-1385.
- Findly, R.C., Gillies, R.J. y Shulman, R.G. (1983) "In vivo phosphorus-31 nuclear magnetic resonance reveals lowered ATP during heat shock of *Tetrahymena*" *Science* **219**:1223-1225.
- Fisher, M.T. (1992) "Promotion of the in vitro renaturation of dodecameric glutamine synthetase from *Escherichia coli* in the presence of GroEL (chaperonin-60) and ATP" *Biochemistry* **31**:3955-3963.
- Flaherty, K.M., Flaherty, C.L. y McCay, D.B. (1990) "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70k heat-shock cognate protein" *Nature* **346**:623-628.
- Flajnik, M.F., Canel, C., Kramer, J. y Kasahara, M. (1991) "Which came first, MHC class I or class II?" *Immunogenetics* **33**:295-300.
- Flynn, G.C., Chappell, T.G. y Rothman, J.E. (1989) "Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly" *Science* **245**:385-390.
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. y Rothman, J.E. (1991) "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP" *Nature* **353**:726-730.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsén, K.R., Chen, K.N. y Woese, C.R. (1980) "The phylogeny of prokaryotes" *Science* **209**:457-63.
- Freitag, H., Janes, M. y Neupert, W. (1982) "Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion into the outer mitochondrial membrane of *Neurospora crassa*" *Eur.J.Biochem.* **126**:197-202.
- Friedl, P., Bienhaus, G., Hoppe, J. y Schairer, H.U. (1981) "The dicyclohexylcarbodiimide-binding protein c of ATP synthase from *Escherichia coli* is not sufficient to express an efficient H⁺ conduction" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78**:6643-6646.
- Friedman, D.I., Olson, E.R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. y Banuett, F. (1984) "Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda" *Microbiol.Rev.* **48**:299-325.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J.S., Tempst, P. y Hartl, F.U. (1992) "Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits" *EMBO J.* **11**:4767-4778.
- Fu, W., Japa, S. y Beattie, D.S. (1990) "Import of the iron-sulfur protein of the cytochrome *b.c1* complex into yeast mitochondria" *J.Biol.Chem.* **265**:16541-16547.
- Furst, P. y Solioz, M. (1985) "Formation of a β -aspartyl phosphate intermediate by the vanadate-sensitive ATPase of *Streptococcus faecalis*" *J.Biol.Chem.* **260**:50-52.
- Futai, M., Kanazawa, H., Takeda, K. y Kagawa, Y. (1980) "Reconstitution of ATPase from the isolated subunits of coupling factor F1's of *Escherichia coli* and thermophilic bacterium PS3" *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **96**:227-34.
- Futai, M., Noumi, T. y Maeda, M. (1989) "ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches" *Annu.Rev.Biochem.* **58**:111-36.
- Gaitinaris, G.A., Papavassiliou, A.G., Rubock, P., Silverstein, S.J. y Gottesman, M.E. (1990) "Reconstitution of denatured lambda repressor requires heat shock proteins" *Cell* **61**:1013-1020. (Abstract)
- Gamer, J., Bujard, H. y Bukau, B. (1992) "Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32" *Cell* **69**:833-842.
- Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G-H. y Cowan, N.J. (1992) "A Cytoplasmic Chaperonin That Catalyzes β -Actin Folding" *Cell* **69**:1043-1050.

- Garboczi, D.N., Fox, A.H., Gerring, S.L. y Pedersen, P.L. (1988) "The β subunit of rat liver mitochondrial ATP synthase: cDNA cloning, amino acid sequence, expression in *Escherichia coli*, and structural relationship to adenylate kinase" *Biochemistry* 27:553-560.
- Garin, J., Boulay, F., Issartel, J.P., Lunardi, J. y Vignais, P.V. (1986) "Identification of amino acid residues photolabelled with 2-azido[a- 32 P] adenosine triphosphate in the β subunit of beef heart mitochondrial ATPase" *Biochemistry* 25:4431-4437.
- Gasser, S.M. y Schatz, G. (1983) "Import of proteins into mitochondria. In vitro studies on the biogenesis of the outer membrane" *J.Biol.Chem.* 258:3427-3430.
- Georgopoulos, C. (1992) "The emergence of chaperone machines" *Trends Biochem.Sci.* 17:295-299.
- Georgopoulos, C.P., Ang, D., Liberek, K. y Zylic, M. (1990) "Properties of the *Escherichia coli* Heat shock proteins and Their Role in Bacteriophage Lambda Growth". En: "Stress Proteins in Biology and Medicine" pp 191-221 (Morimoto, R.I, Tissières, A. y Georgopoulos, C. eds.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R. y Kaiser, A.D. (1973) "Host participation in bacteriophage lambda head assembly" *J.Mol.Biol.* 76:45-60.
- Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Kaiser, A.D. y Wood, W.B. (1972) "Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: effects of a bacterial mutation on T4 head assembly" *Nature New Biol.* 239:38-41.
- Gething, M.J. (1991) "Molecular chaperones: individualists or groupies?" *Curr.Opin.Cell Biol.* 3:610-614.
- Gething, M.J., McCammon, K. y Sambrook, J. (1986) "Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport" *Cell* 46:939-950.
- Gething, M.J. y Sambrook, J. (1992) "Protein folding in the cell" *Nature* 355:33-45.
- Glass, J.R., DeWitt, R.G. y Cress, A.E. (1985) "Rapid loss of stress fibers in Chinese hamster ovary cells after hyperthermia" *Cancer Res.* 45:258-262.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R.L. y Schatz, G. (1992) "Cytochromes *c1* and *b2* Are Sorted to the Intermembrane Space of Yeast Mitochondria by a Stop-transfer Mechanism" *Cell* 69:809-822.
- Goff, S.A. y Goldberg, A.L. (1985) "Production of abnormal proteins in *E.coli* stimulates transcription of ion and other heat-shock genes" *Cell* 41:587-595.
- Goffeau, A. y Slayman, C.W. (1981) "The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane" *Biochim.Biophys.Acta* 639:197-223.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, D., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K. y Yoshida, M. (1989) "Evolution of the vacuolar H^+ -ATPase. Implications for the origins of eukaryotes" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:6661-6665.
- Goldschmidt, R. (1935) "Gen und Ausseneigenschaft. I. (Untersuchung an *Drosophila*)" *Z.Indukt.Abstammungs Vererbungs.* 69:38-131.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. y Schneider, W.J. (1985) "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system" *Annu.Rev.Cell Biol.* 1:1-39.
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A. y Lorimer, G.H. (1989) "Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP" *Nature* 342:884-889.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. y Lorimer, G.H. (1989) "GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*" *Nature* 337:44-47.
- Gray, M.W. y Doolittle, W.F. (1982) "Has the endosymbiont hypothesis been proven?" *Microbiol.Rev.* 46:1-42.
- Gray, M.W., Sankoff, D. y Cedergren, R.J. (1984) "On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA" *Nucleic Acids Res.* 12:5837-5852.
- Grivell, L.A. (1989) "Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis" *Eur.J.Biochem.* 182:477-93.

- Guiard, B. (1985) "Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c reductase (cytochrome b2)" *EMBO J.* **4**:3265-3272.
- Gupta, R.S. (1990) "Sequence and structural homology between a mouse T-complex protein TCP-1 and the 'chaperonin' family of bacterial (GroEL, 60-65 kDa heat shock antigen) and eukaryotic proteins" *Biochem.Int.* **20**:833-841.
- Gupta, R.S., Picketts, D.J. y Ahmad, S. (1989) "A novel ubiquitous protein 'chaperonin' supports the endosymbiotic origin of mitochondrion and plant chloroplast" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **163**:780-787.
- Guthrie, B. y Wickner, W. (1990) "Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export" *J.Bacteriol.* **172**:5555-5562.
- Haas, I.G. y Wabl, M. (1983) "Immunoglobulin heavy chain binding protein" *Nature* **306**:387-389.
- Haas, R.C. y Strauss, A.W. (1990) "Separate nuclear genes encode sarcomere-specific and ubiquitous human mitochondrial creatine kinase isoenzymes" *J.Biol.Chem.* **265**:6921-6927.
- Hallberg, R.L. (1990) "A mitochondrial chaperonin: genetic, biochemical, and molecular characteristics" *Sem.Cell Biol.* **1**:37-45.
- Hamajima, S., Sakaguchi, M., Mihara, K., Ono, S. y Sato, R. (1988) "Both amino- and carboxy-terminal portions are required for insertion of yeast porin into the outer mitochondrial membrane" *J.Biochem.* **104**:362-367.
- Harris, D.A., Radda, G.K. y Slater, E.C. (1977) "Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in oxidative phosphorylation. II. The beef heart mitochondrial system" *Biochim.Biophys.Acta* **459**:560-572.
- Harris, D.A., Rosing, J., Van de Stadt, R.J. y Slater, E.C. (1973) "Tight binding of adenine nucleotides to beef-heart mitochondrial ATPase" *Biochim.Biophys.Acta* **314**:149-153.
- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. y Wickner, W. (1990) "The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane" *Cell* **63**:269-279.
- Hartl, F.U., Martin, J. y Neupert, W. (1992) "Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones hsp70 and hsp60" *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **21**:293-322.
- Hartl, F.U. y Neupert, W. (1990) "Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly" *Science* **247**:930-938.
- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B. y Neupert, W. (1987) "Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide" *Cell* **51**:1027-1037.
- Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. (1986) "Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase" *Cell* **47**:939-951.
- Hartman, D.J., Dougan, D., Hoogenraad, N.J. y Hoj, P.B. (1992) "Heat shock proteins of barley mitochondria and chloroplasts. Identification of organellar hsp 10 and 12: putative chaperonin 10 homologues" *FEBS Lett.* **305**:147-150.
- Hartman, D.J., Hoogenraad, N.J., Condrón, R. y Hoj, P.B. (1992) "Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, a mitochondrial chaperonin 10 homologue essential for assisted folding of trimeric ornithine transcarbamoylase in vitro" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:3394-3398.
- Hase, T., Muller, U., Riezman, H. y Schatz, G. (1984) "A 70-kd protein of the yeast mitochondrial outer membrane is targeted and anchored via its extreme amino terminus" *EMBO J.* **3**:3157-3164.
- Hase, T., Riezman, H., Suda, K. y Schatz, G. (1983) "Import of proteins into mitochondria: nucleotide sequence of the gene for a 70-kd protein of the yeast mitochondrial outer membrane" *EMBO J.* **2**:2169-2172.
- Hatefi, Y. (1985) "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system" *Annu.Rev.Biochem.* **54**:1015-69.
- Hawltischek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U. y Neupert, W. (1988) "Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein" *Cell* **53**:795-806.

- Heine, U., Sverak, L., Kondratick, J. y Bonar, R.A. (1971) "The behavior of HeLa-S3 cells under the influence of supranormal temperatures" *J.Ultrastruct.Res.* **34**:375-396.
- Hemmingsen, S.M. y Ellis, R.J. (1986) "Purification and properties of ribulosebiphosphate carboxylase large subunit binding protein" *Plant Physiol.* **80**:269-276.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. y Ellis, R.J. (1988) "Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly" *Nature* **333**:330-334.
- Hendrick, J.P., Hodges, P.E. y Rosenberg, L.E. (1989) "Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:4056-4060.
- Hendrix, R.W. (1979) "Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly" *J.Mol.Biol.* **129**:375-92.
- Hightower, L.E. (1980) "Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides" *J.Cell Physiol.* **102**:407-427.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brutsch, H. y Schatz, G. (1990) "Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70" *EMBO J.* **9**:3191-3200.
- Hocking, S.M. y Egan, J.B. (1982) "Genetic studies of coliphage 186. I. Genes associated with phage morphogenesis" *J.Virol.* **44**:1056-1067.
- Hollemans, M., Runswick, M.J., Fearnley, I.M. y Walker, J.E. (1983) "The sites of labeling of the β -subunit of bovine mitochondrial F1-ATPase with 8-azido-ATP" *J.Biol.Chem.* **258**:9307-9313.
- Holmgren, A. y Branden, C.I. (1989) "Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold [see comments]" *Nature* **342**:248-251.
- Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I. y Rosenberg, L.E. (1985) "A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein" *EMBO J.* **4**:1129-1135.
- Horwitz, J. (1992) "a-crystallin can function as a molecular chaperon" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:10449-10453.
- Hoyt, D.W., Cyr, D.M., Gierasch, L.M. y Douglas, M.G. (1991) "Interaction of peptides corresponding to mitochondrial presequences with membranes" *J.Biol.Chem.* **266**:21693-21699.
- Hsu, S.Y., Senda, M., Kanazawa, H., Tsuchiya, T. y Futai, M. (1984) "Comparison of F1's of oxidative phosphorylation from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and demonstration of interchangeability of their subunits" *Biochemistry* **23**:988-993.
- Hultgren, S.J., Lindberg, F., Magnusson, G., Kihlberg, J., Tennent, J.M. y Normark, S. (1989) "The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:4357-4361.
- Hurt, E.C., Goldschmidt Clermont, M., Pesold Hurt, B., Rochaix, J.D. y Schatz, G. (1986) "A mitochondrial presequence can transport a chloroplast-encoded protein into yeast mitochondria" *J.Biol.Chem.* **261**:11440-11443.
- Hurt, E.C., Muller, U. y Schatz, G. (1985) "The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane" *EMBO J.* **4**:3509-3518.
- Hurt, E.C., Pesold Hurt, B. y Schatz, G. (1984) "The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix" *EMBO J.* **3**:3149-3156.
- Hurt, E.C. y Schatz, G. (1987) "A cytosolic protein contains a cryptic mitochondrial targeting signal" *Nature* **325**:499-503.
- Hurt, E.C. y van Loon, A.P.M.G. (1986) "How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments?" *Trends Biochem.Sci.* **11**:204-206.
- Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover Litty, H., Helenius, A. y Copeland, C.S. (1989) "Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP)" *J.Cell Biol.* **108**:2117-2126.
- Hurtley, S.M. y Helenius, A. (1989) "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum" *Annu.Rev.Cell Biol.* **5**:277-307.

- Hutchinson, E.G., Tichelaar, W., Hofhaus, G., Weiss, H. y Leonard, K.R. (1989) "Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria" *EMBO J.* **8**:1485-1490.
- Hwang, S.T. y Schatz, G. (1989) "Translocation of proteins across the mitochondrial inner membrane, but not into the outer membrane, requires nucleoside triphosphates in the matrix" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:8432-8436.
- Iida, H. y Yahara, I. (1985) "Yeast heat shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase" *Nature* **315**:688-690.
- Iida, K., Iida, H. y Yahara, I. (1986) "Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells" *Exp.Cell Res.* **165**:207-215.
- Ikawa, S. y Weinberg, R.A. (1992) "An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:2012-2016.
- Imamoto, N., matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Skiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S. y Yoneda, Y. (1992) "Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins" *J.Cell Biol.* **119**:1047-1061.
- Isaya, G., Kalousek, F., Fenton, W.A. y Rosenberg, L.E. (1991) "Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide" *J.Cell Biol.* **113**:65-76.
- Isaya, G., Kalousek, F. y Rosenberg, L.E. (1992) "Sequence analysis of rat mitochondrial intermediate peptidase: Similarity to zinc metallopeptidases and to a putative yeast homologue" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:8317-8321.
- Ishii, N., Taguchi, H., Sumi, M. y Yoshida, M. (1992) "Structure of holo-chaperonin studied with electron microscopy. Oligomeric cpn10 on top of two layers of cpn60 rings with two stripes each" *FEBS Lett.* **299**:169-174.
- Jagendorf, A.T., McCarty, R.E. y Robertson, D. (1991) "Coupling factor components: structure and function". En: "The Photosynthetic apparatus: molecular biology and operation" pp 225-254 (Bogorad, L. y Vasil, I.K. eds.) Academic Press, San Diego.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A.K., Krebs, J., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1988) "Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺-ATPase of human erythrocytes" *J.Biol.Chem.* **263**:2905-2910.
- Jenkins, A.J., March, J.B., Oliver, I.R. y Masters, M. (1986) "A DNA fragment containing the *groE* genes can suppress mutations in the *Escherichia coli* *dnaA* gene" *Mol.Gen.Genet.* **202**:446-454.
- Jensen, R.E. y Yaffe, M.P. (1988) "Import of proteins into yeast mitochondria: the nuclear MAS2 gene encodes a component of the processing protease that is homologous to the MAS1-encoded subunit" *EMBO J.* **7**:3863-3871.
- Jindal, S., Dudani, A.K., Singh, B., harley, A.B. y Gupta, R.S. (1989) "Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen" *Mol.Cell.Biol.* **9**:2279-2283.
- Johnson, R.B., Fearon, K., Mason, T. y Jindal, S. (1989) "Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene" *Gene* **84**:295-302.
- Jones, W.J., Nagle, D.P.J. y Whitman, W.B. (1987) "Methanogens and the diversity of archaebacteria" *Microbiol.Rev.* **51**:135-77.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. y Holmes, K.C. (1990) "Atomic structure of the actin:DNase I complex" *Nature* **347**:37-44.
- Kaine, B.P., Gupta, R. y Woese, C.R. (1983) "Putative introns in tRNA genes of prokaryotes" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**:3309-3312.
- Kalousek, F., Hendrick, J.P. y Rosenberg, L.E. (1988) "Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:7536-7540.
- Kalousek, F., Isaya, G. y Rosenberg, L.E. (1992) "Rat liver intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization" *EMBO J.* **11**:2803-2809.
- Kanaseki, T. y Kadota, K. (1969) "The 'vesicle in a basket'. A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements" *J.Cell Biol.* **42**:202-220.

- Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. y Pfanner, N. (1990) "Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins" *Nature* 348:137-143.
- Kaput, J., Goltz, S. y Blobel, G. (1982) "Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the pre sequence for protein transport into mitochondria" *J.Biol.Chem.* 257:15054-8.
- Kassenbrock, C.K., Garcia, P.D., Walter, P. y Kelly, R.B. (1988) "Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro" *Nature* 333:90-93.
- Kassenbrock, C.K. y Kelly, R.B. (1989) "Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides" *EMBO J.* 8:1461-1467.
- Kawakami, K., Noguchi, S., Noda, M., Takahashi, H., Ohta, T., Kawamura, M., Nojima, H., Nagano, K., Hirose, T., Inayama, S. y et al, (1985) "Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase deduced from cDNA sequence" *Nature* 316:733-736.
- Kelley, P.M. y Schlesinger, M.J. (1978) "The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts" *Cell* 15:1277-1286.
- Kelley, W.L. y Georgopoulos, C. (1992) "Chaperones and protein folding" *Curr.Opin.Cell Biol.* 4:984-991.
- Keng, T., Alani, E. y Guarente, L. (1986) "The nine amino-terminal residues of delta-aminolevulinate synthase direct β -galactosidase into the mitochondrial matrix" *Mol.Cell.Biol.* 6:355-364.
- Khananashvili, D. y Gromet-Elhanan, Z. (1984) "Demonstration of two binding sites for ADP on the isolated β -subunit of the *Rhodospirillum rubrum* R1F0F1-ATP synthase" *FEBS Lett.* 178:10-14.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Sollner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. y Neupert, W. (1990) "Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins" *Nature* 348:610-616.
- Kim, P.S., Bole, D. y Arvan, P. (1992) "Transient Aggregation of Nascent Thyroglobulin in the Endoplasmic Reticulum: Relationship to the Molecular Chaperone BiP" *J.Cell Biol.* 118:541-549.
- Kleiber, J., Kalousek, F., Swaroop, M. y Rosenberg, L.E. (1990) "The general mitochondrial matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:7978-7982.
- Klingerberg, M. (1989) "Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria" *Arch.Biochem.Biophys.* 270:1-14.
- Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. y Hartl, F.U. (1992) "Antifolding Activity of hsp60 Couples Protein Import into the Mitochondrial Matrix with Export to the Intermembrane Space" *Cell* 68:1163-1175.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J. y Sambrook, J. (1988) "The presence of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins" *Nature* 332:462-464.
- Kumamoto, C.A. (1991) "Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane" *Mol.Microbiol.* 5:19-22.
- Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y. y Ito, K. (1989) "Effects of mutations in heat-shock genes groEL on protein export in *escherichia coli*" *EMBO J.* 8:3517-3521.
- Lamb, N.J., Fernandez, A., Feramisco, J.R. y Welch, W.J. (1989) "Modulation of vimentin containing intermediate filament distribution and phosphorylation in living fibroblasts by the cAMP-dependent protein kinase" *J.Cell Biol.* 108:2409-2422.
- Lamiet, A.A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C.P. y Pluckthun, A. (1990) "The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β -lactamase precursor" *EMBO J.* 9:2315-2319.
- Landry, S.J. y Gierasch, L.M. (1991) "Recognition of nascent polypeptides for targeting and folding" *Trends Biochem.Sci.* 16:159-163.
- Landry, S.J. y Gierasch, L.M. (1991) "The chaperonin GroEL binds a polypeptide in an α -helical conformation" *Biochemistry* 30:7359-7362.

- Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R. y Gierasch, L.M. (1992) "Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL" *Nature* **355**:455-457.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. y Hartl, F.U. (1992) "Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding" *Nature* **356**:683-689.
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. y Hartl, F.U. (1992) "Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity" *EMBO J.* **11**:4757-4765.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D. y Finch, J.T. (1978) "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA" *Nature* **275**:416-420.
- Lecker, S., Lill, R., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C.P., Bassford, P.J.J., Kumamoto, C.A. y Wickner, W. (1989) "Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*--SecB, trigger factor and GroEL--form soluble complexes with precursor proteins in vitro" *EMBO J.* **8**:2703-2709.
- Lee, A.S., Bell, J. y Ting, J. (1984) "Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts" *J.Biol.Chem.* **259**:4616-4621.
- Lee, C.K. y Hong, J. (1987) "Enzyme reaction in a membrane cell coupled with electrophoresis" *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **506**:499-510.
- Lee, J.H., Garboczi, D.N., Thomas, P.J. y Pedersen, P.L. (1990) "Mitochondrial ATP synthase, cDNA cloning, amino acid sequence, overexpression and properties of the rat liver a subunit" *J.Biol.Chem.* **265**:4664-4669.
- Lee, S.C. y Olins, P.O. (1992) "Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*" *J.Biol.Chem.* **267**:2849-2852.
- Leenders, H.J., Kemp, A., Koninkx, J.F. y Rosing, J. (1974) "Changes in cellular ATP, ADP and AMP levels following treatments affecting cellular respiration and the activity of certain nuclear genes in *Drosophila* salivary glands" *Exp.Cell Res.* **86**:25-30.
- Lemire, B.D., Fankhauser, C., Baker, A. y Schatz, G. (1989) "The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity" *J.Biol.Chem.* **264**:20206-20215.
- Leustek, T., Dali, B., Amir-Shapira, D., Brot, N. y Weissbach, H. (1989) "A member of the hsp70 family is localized in mitochondria and resembles *Escherichia coli* DnaK" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:7805-7808.
- Levinson, W., Oppermann, H. y Jackson, J. (1980) "Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells" *Biochim.Biophys.Acta* **606**:170-180.
- Lewin, R.A. (1976) "Prochlorophyta as a proposed new division of algae" *Nature* **261**:697-698.
- Lewis, V.A., Hynes, G.M., Zheng, D., Saibil, H. y Willison, K. (1992) "T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol [see comments]" *Nature* **358**:249-252.
- Li, J.M. y Shore, G.C. (1992) "Reversal of the orientation of an integral protein of the mitochondrial outer membrane" *Science* **256**:1815-1817.
- Liberek, K., Galitski, T.P., Zylicz, M. y Georgopoulos, C. (1992) "The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the sigma32 transcription factor" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:3516-3520.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D. y Georgopoulos, C. (1991) "*Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**:2874-2878.
- Lill, R., Stuart, R.A., Drygas, M.E., Nargang, F.E. y Neupert, W. (1992) "Import of cytochrome c heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space" *EMBO J.* **11**:449-456.
- Lindberg, F., Lund, B., Johansson, L. y Normark, S. (1987) "Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus" *Nature* **328**:84-87.
- Lindquist, S. (1986) "The heat-shock response" *Annu.Rev.Biochem.* **55**:1151-1191.
- Lindquist, S. y Craig, E.A. (1988) "The heat-shock proteins" *Annu.Rev.Genet.* **22**:631-677.

- Lissin, N.M., Venyaminov, S.Y. y Girshovich, A.S. (1990) "(Mg-ATP)-dependent self-assembly of molecular chaperone GroEL" *Nature* **348**:339-342.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C. y Evan, G.I. (1987) "Characterization of a heat shock-induced insoluble complex in the nuclei of cells" *J.Cell Sci.* **88**:65-72.
- Liu, X., Freeman, K.B. y Shore, G.C. (1990) "An amino-terminal signal sequence abrogates the intrinsic membrane-targeting information of mitochondrial uncoupling protein" *J.Biol.Chem.* **265**:9-12.
- Lubben, T.H., Donaldson, G.K., Viitanen, P.V. y Gatenby, A.A. (1989) "Many, but not all, proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone" *Plant Cell* **1**:1223-1230.
- Lubben, T.H., Gatenby, A.A., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H. y Viitanen, P.V. (1990) "Identification of a groES-like chaperonin in mitochondria that facilitates protein folding" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:7683-7687.
- Luke, M.M., Sutton, A. y Arndt, K.T. (1991) "Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins" *J.Cell Biol.* **114**:623-638.
- Maarse, A.C., van Loon, A.P., Riezman, H., Gregor, I., Schatz, G. y Grivell, L.A. (1984) "Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein" *EMBO J.* **3**:2831-2837.
- Macara, I.G. (1980) "Vanadium - an element in search of a role" *Trends Biochem.Sci.* **5**:92-94.
- Maccacchini, M.L., Rudin, Y., Blobel, G. y Schatz, G. (1979) "Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**:343-347.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. y Green, N.M. (1985) "Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence" *Nature* **316**:696-700.
- Magdolen, V., Oechsner, U. y Bandlow, W. (1987) "The complete nucleotide sequence of the gene coding for yeast adenylate kinase" *Curr.Genet.* **12**:405-411.
- Magun, B.E. y Fennie, C.W. (1981) "Effects of hyperthermia on binding, internalization and degradation of epidermal growth factor" *Radiat.Res.* **86**:133-146.
- Mahlke, K., Pfanner, N., Martin, J., Horwich, A.L., Hartl, F.U. y Neupert, W. (1990) "Sorting pathways of mitochondrial inner membrane proteins" *Eur.J.Biochem.* **192**:551-555.
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Nelson, H. y Nelson, N. (1988) "cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:5521-5524.
- Manning Krieg, U.C., Scherer, P.E. y Schatz, G. (1991) "Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix" *EMBO J.* **10**:3273-3280.
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, K. y Vierling, E. (1990) "Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:374-378.
- Martel, R., Cloney, L.P., Pelcher, L.E. y Hemmingsen, S.M. (1990) "Unique composition of plastid chaperonin-60: α and β polypeptide-encoding genes are highly divergent" *Gene* **94**:181-187.
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L. y Hartl, F.U. (1991) "Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate" *Nature* **352**:36-42.
- Mayrand, S. y Pederson, T. (1983) "Heat shock alters nuclear ribonucleoprotein assembly in *Drosophila* cells" *Mol.Cell.Biol.* **3**:161-171.
- Mazzarella, R.A. y Green, M. (1987) "ERp99, an abundant conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat-shock protein (hsp90) and the glucose regulated protein (grp94)" *J.Biol.Chem.* **262**:8875-8883.
- McMullin, T.W. y Hallberg, R.L. (1987) "A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*" *Mol.Cell.Biol.* **7**:4414-4423.
- McMullin, T.W. y Hallberg, R.L. (1988) "A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* groEL gene" *Mol.Cell.Biol.* **8**:371-380.

- Mehdi, S.Q., Recktenwald, D.J., Smith, L.M., Li, G.C., Armour, E.P. y Hahn, G.M. (1984) "Effect of hyperthermia on murine cell surface histocompatibility antigens" *Cancer Res.* **44**:3394-3397.
- Mendoza, J.M., Rogers, E., Lorimer, G.H. y Horowitz, P.M. (1991) "Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanase" *J.Biol.Chem.* **266**:13044-13049.
- Mihara, K., Blobel, G. y Sato, R. (1982) "In vitro synthesis and integration into mitochondria of porin, a major protein of the outer mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:7102-7106.
- Mitchell, P. (1974) "A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases" *FEBS Lett.* **43**:189-194.
- Mitoma, J. y Ito, A. (1992) "Mitochondrial targeting signal of rat liver monoamine oxidase B is located at its carboxy terminus" *J.Biochem.* **111**:20-24.
- Miura, S., Amaya, Y. y Mori, M. (1986) "A metalloprotease involved in the processing of mitochondrial precursor proteins" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **134**:1151-1159.
- Miura, S., Mori, M. y Tatibana, M. (1983) "Transport of ornithine carbamoyltransferase precursor into mitochondria. Stimulation by potassium ion, magnesium ion, and a reticulocyte cytosolic protein(s)" *J.Biol.Chem.* **258**:6671-6674.
- Mizobata, T., Akiyama, Y., Ito, K., Yumoto, N. y Kawata, Y. (1992) "Effects of the chaperonin GroE on the refolding of tryptophanase from *Escherichia coli*" *J.Biol.Chem.* **267**:17773-17779.
- Mizzen, L.A., Chang, C., Garrels, J.I. y Welch, W.J. (1989) "Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein" *J.Biol.Chem.* **264**:20664-20675.
- Mizzen, L.A., Kabiling, A.N. y Welch, W.J. (1991) "The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp75 and hsp58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins" *Cell Regulation* **2**:165-179.
- Moczko, M., Dietmeier, K., Söllner, T., Segui, B., Steger, H.F., Neupert, W. y Pfanner, N. (1992) "Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*" *FEBS Lett.* **310**:265-268.
- Morange, M., Diu, A., Bemsauze, O. y Babinet, C. (1984) "Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells" *Mol.Cell.Biol.* **4**:730-735.
- Morimoto, R.I. y Milarski, K.L. (1990) "Expression and Function of Vertebrate hsp70 Genes". En: "Stress proteins in Biology and Medicine" pp 232-359 (Morimoto, R.I, Tissières, A. y Georgopoulos, C. eds.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Moriyama, Y. y Nelson, N. (1987) "Nucleotide binding sites and chemical modification of the chromaffin granule proton ATPase" *J.Biol.Chem.* **262**:14723-14729.
- Moriyama, Y. y Nelson, N. (1988) "The vacuolar H⁺-ATPase, a proton pump controlled by a slip". En: "The ion pumps, structure, function and regulation" pp 387-394 (Stein, W.D. eds.) Alan R. Liss, New York.
- Moriyama, Y. y Nelson, N. (1989) "Lysosomal H⁺-translocating ATPase has a similar subunit structure to chromaffin granule H⁺-ATPase complex" *Biochim.Biophys.Acta* **980**:241-247.
- Moriyama, Y. y Nelson, N. (1989) "H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures" *J.Biol.Chem.* **264**:18445-18450.
- Moriyama, Y. y Nelson, N. (1989) "Cold inactivation of vacuolar proton-ATPases" *J.Biol.Chem.* **264**:3577-3582.
- Morrison, S.I. y Scharff, M.D. (1975) "Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line" *Immunol.* **114**:655-659.
- Munro, S. y Pelham, H.R. (1986) "An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein" *Cell* **46**:291-300.
- Murakami, H., Blobel, G. y Pain, D. (1990) "Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor" *Nature* **347**:488-491.

- Murakami, H., Pain, D. y Blobel, G. (1988) "70-kD Heat-Shock-related Protein is One of at least Two Distinct Cytosolic Factors stimulating protein Import into Mitochondria" *J.Cell Biol.* **107**:2051-2057.
- Murakami, K. y Mori, M. (1990) "Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein" *EMBO J.* **9**:3201-3208.
- Murakami, K., Tanase, S., Morino, Y. y Mori, M. (1992) "Presequence Binding Factor-dependent and -independent Import of proteins into Mitochondria" *J.Biol.Chem.* **267**:13119-13122.
- Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S. y Mori, M. (1990) "Presequence Does Not Prevent Folding of a Purified Mitochondrial Precursor Protein and Is Essential for Association with a Reticulocyte Lysate" *J.Biochem.* **108**:207-214.
- Neidhart, J.E., Phillips, T.A., van Bogelen, P.A., Smith, M.W., Georgalis, Y. y Subramanian, A.R. (1981) "Identity of the B56.2 protein, the A-protein, and the groE gene product of *Escherichia coli*" *J.Bacteriol.* **145**:513-520.
- Nelson, H., Mandiyan, S., Noumi, T., Moriyama, Y., Miedel, M.C. y Nelson, N. (1990) "Molecular cloning of cDNA encoding the C subunit of H(+)-ATPase from bovine chromaffin granules" *J.Biol.Chem.* **265**:20390-20393.
- Nelson, N. (1989) "Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H+-ATPases" *J.Bioenerg.Biomembr.* **21**:553-571.
- Nelson, N. (1991) "Structure and pharmacology of the proton-ATPases" *Trends Pharmacol.Sci.* **12**:71-75.
- Nelson, N. (1992) "Organellar proton-ATPases" *Curr.Opin.Cell Biol.* **4**:654-660.
- Nelson, N. (1992) "Evolution of organellar proton-ATPases" *Biochim.Biophys.Acta* **1100**:109-124.
- Nelson, N., Nelson, H. y Schatz, G. (1980) "Biosynthesis and assembly of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex from chloroplasts" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**:1361-1364.
- Nelson, N. y Taiz, L. (1989) "The evolution of H+-ATPases" *Trends Biochem.Sci.* **14**:113-116.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. y Craig, E.A. (1992) "The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis" *Cell* **69**:97-105.
- Neumann, D., Scharf, K.D. y Nover, L. (1984) "Heat-shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat-shock proteins" *Eur.J.Cell Biol.* **34**:254-264.
- Nguyen, M., Bell, A.W. y Shore, G.C. (1988) "Protein sorting between mitochondrial membranes specified by position of the stop-transfer domain" *J.Cell Biol.* **106**:1499-1505.
- Nguyen, T.H., Law, D.T. y Williams, D.B. (1991) "Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**:1565-1569.
- Nicholson, D.W., Hergersberg, C. y Neupert, W. (1988) "Role of cytochrome c heme lyase in the import of cytochrome c into mitochondria" *J.Biol.Chem.* **263**:19034-19042.
- Nicholson, D.W., Stuart, R.A. y Neupert, W. (1989) "Biogenesis of cytochrome c1. Role of cytochrome c1 heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import into mitochondria" *J.Biol.Chem.* **264**:10156-10168.
- Nishigaki, I., Chen, F.T. y Hokin, L.E. (1974) "Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. XV. Direct chemical characterization of the acyl phosphate in the enzyme as an aspartyl β -phosphate residue" *J.Biol.Chem.* **249**:4911-4916.
- Nolta, K.V., Padh, H. y Steck, T.L. (1991) "Acidosomes from *Dictyostelium*. Initial biochemical characterization" *J.Biol.Chem.* **266**:18318-18323.
- Norgren, M., Normark, S., Lark, D., O'Hanley, P., Schoolnik, G., Falkow, S., Svanborg Eden, C., Baga, M. y Uhlin, B.E. (1984) "Mutations in *E coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation" *EMBO J.* **3**:1159-1165.

- Notarianni, E.L. y Preston, C.M. (1982) "Activation of cellular stress protein genes by herpes simplex virus temperature-sensitive mutants which overproduce immediate early polypeptides" *Virology* **123**:113-22.
- Noumi, T., Maeda, M. y Futai, M. (1988) "A homologous sequence between H⁺-ATPase (F₀F₁) and cation-transporting ATPases. Thr-285----Asp replacement in the β subunit of *Escherichia coli* F₁ changes its catalytic properties" *J.Biol.Chem.* **263**:8765-8770.
- Noumi, T., Mosher, M.E., natori, S., Futai, M. y Kanazawa, H. (1984) "A phenylalanine for serine substitution in the β subunit of *Escherichia coli* F₁-ATpase affects dependence of its activity on divalent cations" *J.Biol.Chem.* **259**:10071-10075.
- Ohba, M. y Schatz, G. (1987) "Protein import into yeast mitochondria is inhibited by antibodies raised against 45-kd proteins of the outer membrane" *EMBO J.* **6**:2109-2115.
- Ohta, S. y Schatz, G. (1984) "A purified precursor polypeptide requires a cytosolic protein fraction for import into mitochondria" *EMBO J.* **3**:651-657.
- Olden, K., Pratt, R.M. y Yamada, K.M. (1978) "Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: effects of tunicamycin on the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts" *Cell* **13**:461-473.
- Ono, H. y Tuboi, S. (1990) "Purificaion and Identification of a Cytosolic Factor Required for Import of Precursors of Mitochondrial Proteins into Mitochondria" *Arch.Biochem.Biophys.* **280**:299-304.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. y Hartl, F.U. (1989) "Protein Folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis" *Nature* **341**:125-130.
- Ostermann, J., Voos, W., Kang, P.-J., Craig, E.A., Neupert, W. y Pfanner, N. (1990) "Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix" *FEBS Lett.* **277**:281-284.
- Ou, W.-J., Ito, A., Okazaki, H. y Omura, T. (1989) "Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria" *EMBO J.* **8**:2605-2612.
- Pain, D., Murakami, H. y Blobel, G. (1990) "Identification of a receptor for protein import into mitochondria" *Nature* **347**:444-449.
- Palleros, D.R., Welch, W.J. y Fink, A.L. (1991) "Interaction of hsp70 with unfolded proteins: Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**:5719-5723.
- Pancic, P.G., Strotmann, H. y Kowallik, K.V. (1991) "The delta subunit of the chloroplast ATPase is plastid-encoded in the diatom *Odontella sinensis*" *FEBS Lett.* **280**:387-392.
- Parsell, D.A. y Sauer, R.T. (1989) "Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation" *Genes Dev.* **3**:1226-1232.
- Pauli, D. y Tissieres, A. (1990) "Developmental expression of the heat shock genes in *Drosophila melanogaster*". En: "Stress proteins in biology and medicine" pp 361-378 (Morimoto, R.I, Tissières, A. y Georgopoulos, C. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1987) "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function" *Trends Biochem.Sci.* **12**:146-150.
- Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1987) "Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output" *Trends Biochem.Sci.* **12**:186-189.
- Pelham, H.R.B. (1984) "Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock" *EMBO J.* **3**:3095-3100.
- Peluso, R.W., Lamb, R.A. y Choppin, P.W. (1978) "Infection with paramyxoviruses stimulates synthesis of cellular polypeptides that are also stimulated in cells transformed by Rous sarcoma virus or deprived of glucose" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **75**:6120-4.
- Penefsky, H.S. y Cross, R.L. (1991) "Structure and mechanism of F₀F₁-type ATP syntahses and ATPases". En: "Advances in enzymology and related areas of molecular biology" pp 173-214 (Meister, A. eds.) John Wiley & Sons, New York.
- Peralta, D., Hartman, D.J., McIntosh, A.M., Hoogenraad, N.J. y Hoj, P.B. (1990) "cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver prehs60 (chaperonin-60)" *Nucleic Acids Res.* **18**:7162.

- Perlin, D.S., Latchney, L.R. y Senior, A.E. (1985) "Inhibition of *Escherichia coli* H⁺-ATPase by venturicidin, oligomycin and ossamycin" *Biochim.Biophys.Acta* 807:238-244.
- Pfaller, R., Steger, H.F., Rassow, J., Pfanner, N. y Neupert, W. (1988) "Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site" *J.Cell Biol.* 107:2483-2490.
- Pfanner, N., Hartl, F.U., Guiard, B. y Neupert, W. (1987) "Mitochondrial precursor proteins are imported through a hydrophilic membrane environment" *Eur.J.Biochem.* 169:289-293.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M. y Neupert, W. (1987) "The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria" *J.Biol.Chem.* 262:14851-14854.
- Pfanner, N. y Weinzierl, A. (1992) "Mechanisms of mitochondrial protein import" *Int.J.Biochem.* 24:65-69.
- Phelps, A., Schobert, C.T. y Wohlrab, H. (1991) "Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Biochemistry* 30:248-252.
- Phillips, G.J. y Silhavy, T.J. (1990) "Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E.coli*" *Nature* 344:882-884.
- Pick, U. y Racker, E. (1979) "Purification and reconstitution of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts" *J.Biol.Chem.* 254:2793-2799.
- Picketts, D.J., Mayanil, C.S. y Gupta, R.S. (1989) "Molecular cloning of a Chinese hamster mitochondrial protein related to the "chaperonin" family of bacterial and plant proteins" *J.Biol.Chem.* 264:12001-12008.
- Pleet, H., Graham, J.M.J. y Smith, D.W. (1981) "Central nervous system and facial defects associated with maternal hyperthermia at four to 14 weeks' gestation" *Pediatrics* 67:785-789.
- Pollock, R.A., Hartl, F.U., Cheng, M.Y., Ostermann, J., Horwich, A. y Neupert, W. (1988) "The processing peptidase of yeast mitochondria: the two co-operating components MPP and PEP are structurally related" *EMBO J.* 7:3493-3500.
- Pouyssegur, J., Shiu, R.P. y Pastan, I. (1977) "Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation" *Cell* 11:941-7.
- Prasad, T.K., Hack, E. y Hallberg, R.L. (1990) "Function of the maize mitochondrial chaperonin hsp60: specific association between hsp60 and newly synthesized F1-ATPase a subunits" *Mol.Cell.Biol.* 10:3979-3986.
- Prasad, T.K. y Hallberg, R.L. (1989) "Identification and metabolic characterization of the *Zea mays* mitochondrial homolog of the *Escherichia coli* groEL protein" *Plant Mol.Biol.* 12:609-618.
- Pushkin, A.V., Tsuprun, V.L., Solovjeva, N.A., Shubin, V.V., Evstignneva, Z.G. y Kretovich, W.L. (1982) "High molecular weight pea leaf protein similar to the GroE protein of *Escherichia coli*" *Biochim.Biophys.Acta* 704:379-384.
- Randall, L.L. (1992) "Peptide binding by chaperone SecB: implications for recognition of nonnative structure" *Science* 257:241-245.
- Randall, S.K. y Shore, G.C. (1989) "Import of a mutant mitochondrial precursor fails to respond to stimulation by a cytosolic factor" *FEBS Lett.* 250:561-564.
- Rapoport, T. (1991) "Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries" *FASEB J.* 5:2792-2798.
- Rassow, J., Guiard, B., Wienhues, U., Herzog, V., Hartl, F.U. y Neupert, W. (1989) "Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites" *J.Cell Biol.* 109:1421-1428.
- Rassow, J. y Pfanner, N. (1991) "Mitochondrial preproteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space" *FEBS Lett.* 293:85-88.
- Reading, D.S., Hallberg, R.L. y Myers, A.M. (1989) "Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor" *Nature* 337:655-659.

- Reid, G.A. y Schatz, G. (1982) "Import of proteins into mitochondria. Extramitochondrial pools and post-translational import of mitochondrial protein precursors in vivo" *J.Biol.Chem.* **257**:13062-13067.
- Reid, G.A. y Schatz, G. (1982) "Import of proteins into mitochondria. Yeast cells grown in the presence of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazide accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides" *J.Biol.Chem.* **257**:13056-13061.
- Ribes, V., Römisch, K., Giner, A., Dobberstein, B. y Tollervey, D. (1990) "*E.coli* 4.5S RNA is part of a ribonucleoprotein particle that has properties related to signal recognition particle" *Cell* **63**:591-600.
- Richter, M.L., Gromet Elhanan, Z. y McCarty, R.E. (1986) "Reconstitution of the H⁺-ATPase complex of *Rhodospirillum rubrum* by the β subunit of the chloroplast coupling factor I" *J.Biol.Chem.* **261**:12109-12113.
- Riezman, H., Hase, T., van Loon, A.P., Grivell, L.A., Suda, K. y Schatz, G. (1983) "Import of proteins into mitochondria: a 70 kilodalton outer membrane protein with a large carboxy-terminal deletion is still transported to the outer membrane" *EMBO J.* **2**:2161-2168.
- Rippmann, F., Taylor, W.R., Rothbard, J.B. y Green, N.M. (1991) "A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA" *EMBO J.* **10**:1053-1059.
- Ritossa, F. (1962) "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*" *Experientia* **13**:571-573.
- Ritossa, F. (1963) "New puffs induced by temperature shock, DNP and salicylate in salivary chromosomes of *D.melanogaster*" *Drosophila Inf. Service* **37**:122-123.
- Ritossa, F. (1964) "Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*" *Exp.Cell Res.* **35**:602-607.
- Robbins, A.R., Oliver, C., Bateman, J.L., Krag, S.S., Galloway, C.J. y Mellman, I. (1984) "A single mutation in Chinese hamster ovary cells impairs both Golgi and endosomal functions" *J.Cell Biol.* **99**:1296-1308.
- Rodewald, R. y Kraehenbuhl, J.P. (1984) "Receptor-mediated transport of IgG" *J.Cell Biol.* **99**:159s-164s.
- Roise, D., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H. y Schatz, G. (1986) "A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers" *EMBO J.* **5**:1327-1334.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., Allison, D.S. y Schatz, G. (1988) "Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function" *EMBO J.* **7**:649-653.
- Rose, D.W., Wettenthal, R.E., Kudlicki, W., Kramer, G. y Hardesty, B. (1987) "The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 a kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein" *Biochemistry* **26**:6583-6587.
- Rose, J.K. y Doms, R.W. (1988) "Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum" *Annu.Rev.Cell Biol.* **4**:257-88.
- Rose, M.D., Misra, L.M. y Vogel, J.P. (1989) "KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene [published erratum appears in *Cell* 1989 Aug 25; 58(4):following 801]" *Cell* **57**:1211-1221.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. y Schekman, R. (1989) "Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast" *J.Cell Biol.* **109**:2641-2652.
- Rothman, J.E. (1989) "Polypeptide Chain Binding Proteins: catalysts of Protein Folding and related processes in Cells" *Cell* **59**:591-601.
- Rothman, J.E. y Schmid, S.L. (1986) "Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles" *Cell* **46**:5-9.
- Ruben, S.M., VanDenBrink Webb, S.E., Rein, D.C. y Meyer, R.R. (1988) "Suppression of the *Escherichia coli* ssb-1 mutation by an allele of groEL" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:3767-3771.

- Runswick, M.J., Powell, S.J., Nyren, P. y Walker, J.E. (1987) "Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein" *EMBO J.* **6**:1367-1373.
- Sadis, S. y Hightower, L.E. (1992) "Unfolded proteins stimulate chaperone Hsc70 ATPase by accelerating ADP/ATP exchange" *Biochemistry* **31**:9406-9412.
- Sadis, S., Raghavendra, K. y Hightower, L.E. (1990) "Secondary Structure of the Mammalian 70-Kilodalton Heat-Shock Cognate Protein Analyzed by Circular Dichroism spectroscopy and Secondary Structure Prediction" *Biochemistry* **29**:8199-8206.
- Sadler, I., Suda, K., Schatz, G., Kaudewitz, F. y Haid, A. (1984) "Sequencing of the nuclear gene for the yeast cytochrome *c1* precursor reveals an unusually complex amino-terminal presequence" *EMBO J.* **3**:2137-2143.
- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J. y Pratt, W.B. (1985) "Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein" *J.Biol.Chem.* **260**:12398-12401.
- Sandvig, K. y Olsnes, S. (1980) "Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH" *J.Cell Biol.* **87**:828-832.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. y Wittinghofer, A. (1990) "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins" *Trends Biochem.Sci.* **15**:430-434.
- Scherer, P.E., Krieg, U.C., Hwang, S.T., Vestweber, D. y Schatz, G. (1990) "A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein" *EMBO J.* **9**:4315-4322.
- Scherer, P.E., Manning Krieg, U.C., Jenö, P., Schatz, G. y Horst, M. (1992) "Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:11930-11934.
- Schleyer, M. y Neupert, W. (1985) "Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes" *Cell* **43**:339-350.
- Schmid, S.L., Braell, W.A. y Rothman, J.E. (1985) "ATP catalyzes the sequestration of clathrin during enzymatic uncoating" *J.Biol.Chem.* **260**:10057-10062.
- Schmidt, M. y Buchner, J. (1992) "Interaction of GroE with an All- β -Protein" *J.Biol.Chem.* **267**:16829-16833.
- Schmidt, W., Winkler, H. y Plattner, H. (1982) "Adrenal chromaffin granules: evidence for an ultrastructural equivalent of the proton-pumping ATPase" *Eur.J.Cell Biol.* **27**:96-104.
- Schneider, E. y Altendorf, K. (1987) "Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F1F0): purification and reconstitution of F0 complexes and biochemical and functional characterization of their subunits" *Microbiol.Rev.* **51**:477-97.
- Schneider, H., Söllner, T., Dietmeier, K., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Trülsch, B., Neupert, W. y Pfanner, N. (1991) "Targeting of Master receptor MOM19 to Mitochondria" *Science* **254**:1659-1662.
- Senda, M., Kanazawa, H., Tsuchiya, T. y Futai, M. (1983) "Conformational changes of the α subunit of *Escherichia coli* F1-ATPase: ATP changes the trypsin sensitivity of the subunit" *Arch.Biochem.Biophys.* **220**:398-404.
- Senior, A.E. (1991) "The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*" *Annu.Rev.Biophys.Chem.* **19**:7-41.
- Serrano, R., Kielland Brandt, M.C. y Fink, G.R. (1986) "Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases" *Nature* **319**:689-693.
- Shaefer, E.L., Morimoto, R.I., Theodorakis, N.G. y Seidenfeld, J. (1988) "Chemical specificity for induction of stress response genes by DNA-damaging drugs in human adenocarcinoma cells" *Carcinogenesis* **9**:1733-1738.
- Sherman, M.Y. y Goldberg, A.L. (1992) "Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin GroEL by inducing its phosphorylation" *Nature* **357**:167-169.
- Shi, Y. y Thomas, J.O. (1992) "The transport of protein into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate" *Mol.Cell.Biol.* **12**:2186-2192.
- Shull, G.E., Schwartz, A. y Lingrel, J.B. (1985) "Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a complementary DNA" *Nature* **316**:691-695.

- Silver, L.M., Artzt, K. y Bennet, D. (1979) "A major testicular cell protein specified by a mouse T/t complex gene" *Cell* **17**:275-284.
- Skowrya, D., Georgopoulos, C.P. y Zylicz, M. (1990) "The *E.coli* *dnaK* Gene Product, the *hsp70* Homolog, Can Reactivate Heat-Inactivated RNA polymerase in an ATP Hydrolysis-Dependent Manner" *Cell* **62**:939-944.
- Slonim, L.N., Pinker, J.S., Brnaden, C-I. y Hultgren, S.J. (1992) "Interactive surface in the PapD chaperone cleft is conserved in pilus chaperone superfamily and essential in subunit recognition and assembly" *EMBO J.* **11**:4747-4756.
- Smagula, C. y Douglas, M.G. (1988) "Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation" *J.Biol.Chem.* **263**:6783-6790.
- Sollner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. y Neupert, W. (1990) "A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier" *Cell* **62**:107-115.
- Sollner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W. y Pfanner, N. (1992) "Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates" *Nature* **355**:84-87.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R. y Neupert, W. (1989) "MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins" *Cell* **59**:1061-1070.
- Steger, H.F., Sollner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K.A., Pfaller, R., Trulzsch, K.S., Tropschug, M., Neupert, W. y Pfanner, N. (1990) "Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel" *J.Cell Biol.* **111**:2353-2363.
- Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. y Hahn, G.M. (1986) "Rapid increases in inositol trisphosphate and intracellular Ca^{++} after heat shock" *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **137**:826-833.
- Stiggall, D.L., Galante, Y.M. y Hatefi, Y. (1978) "Preparation and properties of an ATP-Pi exchange complex (complex V) from bovine heart mitochondria" *J.Biol.Chem.* **253**:956-64.
- Straus, D., Walter, W. y Gross, C.A. (1990) "DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32" *Genes Dev.* **4**:2202-2209.
- Stuart, R.A. y Neupert, W. (1990) "Apocytochrome c: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway" *Biochimie* **72**:115-121.
- Subjeck, J.R. y Shyy, T.T. (1986) "Stress proteins of mammalian cells" *Am.J.Physiol.* **17**:250-C1-C17.
- Suissa, M. y Schatz, G. (1982) "Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes" *J.Biol.Chem.* **257**:13048-13055.
- Südhof, T.C., Fried, V.A., Stone, D.K., Johnston, P.A. y Xie, X.-S. (1989) "Human endomembrane H^{+} pump strongly resembles the ATP-synthase of Archeobacteria" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:6067-6071.
- Süss, K.-H. (1980) "Identification of chloroplast thylacoid membrane polypeptides. ATPase complex (CF1-CF0) and light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein (LHCP) complex" *FEBS Lett.* **112**:255-259.
- Sztul, E.S., Biemesderfer, D., Caplan, M.J., Kashgarian, M. y Boyer, J.L. (1987) "Localization of Na^{+}, K^{+} -ATPase α -subunit to the sinusoidal and lateral but not canalicular membranes of rat hepatocytes" *J.Cell Biol.* **104**:1239-1248.
- Sztul, E.S., Chu, T.W., Strauss, A.W. y Rosenberg, L.E. (1988) "Import of the malate dehydrogenase precursor by mitochondria. Cleavage within leader peptide by matrix protease leads to formation of intermediate-sized form" *J.Biol.Chem.* **263**:12085-12091.
- Taguchi, H., Konishi, J., Ishii, N. y Yoshida, M. (1991) "A chaperonin from a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, that controls refolding of several thermophilic enzymes" *J.Biol.Chem.* **266**:22411-22418.
- Takeda, K., Hirano, M., Kanazawa, H., Nukiwa, N., Kagawa, Y. y Futai, M. (1982) "Hybrid ATPase's formed from subunits of coupling factor F1's of *Escherichia coli* and thermophilic bacterium PS3" *J.Biochem.* **91**:695-701.

- Thomas, G.P., Welch, W.J., Mathews, M.B. y Feramisco, J.R. (1982) "Molecular and cellular effects of heat shock and related treatments of mammalian tissue culture cells" *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* **46**:985-996.
- Thorne, S.W., Newcomb, E.H. y Osmond, C.B. (1977) "Identification of chlorophyll *b* in extracts of prokaryotic algae by fluorescence spectroscopy" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**:575-578.
- Tilly, K. y Georgopoulos, C. (1982) "Evidence that the two *Escherichia coli* *groE* morphogenetic gene products interact in vivo" *J.Bacteriol.* **149**:1082-1088.
- Toll, L. y Howard, B.D. (1980) "Evidence that an ATPase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles" *J.Biol.Chem.* **255**:1787-1789.
- Trent, J.D., Nimmegern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U. y Horwich, A.L. (1991) "A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein *t*-complex polypeptide-1" *Nature* **354**:490-493.
- Ungewickell, E. (1985) "The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin from coated vesicles" *EMBO J.* **4**:3385-3391.
- Ursic, D. y Culbertson, M.R. (1991) "The yeast homolog to mouse *Tcp-1* affects microtubule-mediated processes" *Mol.Cell.Biol.* **11**:2629-2640.
- Valcarce, C., Navarrete, R.M., Encabo, P., Loeches, E., Satrústegui, J. y Cuezva, J.M. (1988) "Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides" *J.Biol.Chem.* **263**:7767-7775.
- van den Boogaart, P., Samallo, J. y Agsteribbe, E. (1982) "Similar genes for a mitochondrial ATPase subunit in the nuclear and mitochondrial genomes of *Neurospora crassa*" *Nature* **298**:187-9.
- van der Goot, F.G., Lakey, J.H. y Pattus, F. (1992) "The molten globule intermediate for protein insertion or translocation through membranes" *Trends Cell Biol.* **2**:343-348.
- Van Dyk, T.K., Gatenby, A.A. y LaRossa, R.A. (1989) "Demonstration by genetic suppression of interaction of *GroE* products with many proteins" *Nature* **342**:451-453.
- van Loon, A.P., Brandli, A.W., Pesold Hurt, B., Blank, D. y Schatz, G. (1987) "Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'matrix-targeting' and the 'sorting' domains in the cytochrome *c1* presequence" *EMBO J.* **6**:2433-2439.
- van Loon, A.P. y Schatz, G. (1987) "Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome *c1* presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane" *EMBO J.* **6**:2441-2448.
- Vassarotti, A., Chen, W.J., Smagula, C. y Douglas, M.G. (1987) "Sequences distal to the mitochondrial targeting sequences are necessary for the maturation of the *F1*-ATPase β -subunit precursor in mitochondria" *J.Biol.Chem.* **262**:411-418.
- Velazquez, J.M., DiDomenico, B.J. y Lindquist, S. (1980) "Intracellular localization of heat shock proteins in *Drosophila*" *Cell* **20**:679-689.
- Velazquez, J.M. y Lindquist, S. (1984) "hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery" *Cell* **36**:655-662.
- Venner, T.J., Singh, B. y Gupta, R.S. (1990) "Nucleotide sequences and novel structural features of human and Chinese hamster hsp60 (chaperonin) gene families" *DNA Cell Biol.* **9**:545-552.
- Verburg, J.G. y Allison, W.S. (1990) "Tyrosine a 244 is derivatized when the bovine heart mitochondrial *F1*-ATPase is inactivated with 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoylthienoadenosine" *J.Biol.Chem.* **265**:8065-8074.
- Vestweber, D. y Schatz, G. (1988) "A chimeric mitochondrial precursor protein with internal disulfide bridges blocks import of authentic precursors into mitochondria and allows quantitation of import sites" *J.Cell Biol.* **107**:2037-2043.
- Vestweber, D. y Schatz, G. (1989) "DNA-protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway" *Nature* **338**:170-172.
- Viebrock, A., Perz, A. y Sebald, W. (1982) "The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA" *EMBO J.* **1**:565-571.

- Viitanen, P.V., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H., Lubben, T.H. y Gatenby, A.A. (1991) "Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase" *Biochemistry* **30**:9716-9723.
- Viitanen, P.V., Gatenby, A.A. y Lorimer, G.H. (1992) "Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative state of a multitude of Escherichia coli proteins" *Protein Sci.* **1**:363-369.
- Viitanen, P.V., Lorimer, G.H., Seetharam, R., Gupta, R.S., Oppenheim, J., Thomas, J.O. y Cowan, N.J. (1992) "Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring" *J.Biol.Chem.* **267**:695-698.
- Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D.P. y Lorimer, G.H. (1990) "Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebiphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K⁺ dependent" *Biochemistry* **29**:5665-5671.
- Vogel, J.P., Misra, L.M. y Rose, M.D. (1990) "Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast" *J.Cell Biol.* **110**:1885-1895.
- Vogel, P.D. y Cross, R.L. (1991) "Adenine nucleotide-binding sites on mitochondrial F1-ATPase. evidence for an adenylate kinase-like orientation of catalytic and noncatalytic sites" *J.Biol.Chem.* **266**:6101-6105.
- von Heijne, G. (1986) "Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices" *EMBO J.* **5**:1335-1342.
- von Heijne, G., Steppuhn, J. y Herrmann, R.G. (1989) "Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides" *Eur.J.Biochem.* **180**:535-545.
- Wada, M. y Itikawa, H. (1984) "Participation of Escherichia coli K-12 groE gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA" *J.Bacteriol.* **157**:694-696.
- Waegemann, K., Paulsen, H. y Soll, J. (1990) "Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence" *FEBS Lett.* **261**:89-92.
- Walker, J.E., Powell, S.J., Viñas, O. y Runswick, M.J. (1989) "ATP synthase from bovine mitochondria: complementary DNA sequence of the import precursor of a heart isoform of the a subunit" *Biochemistry* **28**:4702-4708.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. y Gay, N.J. (1982) "Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold" *EMBO J.* **1**:945-951.
- Wallace, D.C. (1982) "Structure and evolution of organelle genomes" *Microbiol.Rev.* **46**:208-40.
- Walter, P. y Blobel, G. (1981) "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes" *J.Cell Biol.* **91**:557-561.
- Wang, J.H. (1983) "Coupling of proton flux to the hydrolysis and synthesis of ATP" *Annu.Rev.Biophys.Bioeng.* **12**:21-34.
- Warren, A.P., James, M.H., Menzies, D.E., Widnell, C.C., Whitaker Dowling, P.A. y Pasternak, C.A. (1986) "Stress induces an increased hexose uptake in cultured cells" *J.Cell Physiol.* **128**:383-388.
- Watanabe, M. y Blobel, G. (1989) "Cytosolic factor purified from Escherichia coli is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**:2728-2732.
- Weinbach, E.C. y Garbus, J. (1968) "Structural changes in mitochondria induced by uncoupling reagents. The response to proteolytic enzymes" *Biochem.J.* **106**:711-717.
- Weitzel, G., Pilatus, U. y Rensing, L. (1985) "Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast" *Exp.Cell Res.* **159**:252-256.
- Welch, W.J. (1990) "The mammalian Stress response: Cell Physiology and Biochemistry of Stress Proteins". En: "Stress Proteins in Biology and Medicine" pp 223-278 (Morimoto, R.I, Tissières, A. y Georgopoulos, C. eds.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Welch, W.J. y Feramisco, J.R. (1985) "Disruption of the three cytoskeletal networks in mammalian cells does not affect transcription, translation, or protein translocation changes induced by heat shock" *Mol.Cell.Biol.* **5**:1571-1581.
- Welch, W.J. y Suhan, J.P. (1985) "Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of

- intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment*" *J.Cell Biol.* **101**:1198-1211.
- Whelan, S.A. y Hightower, L.E. (1985) "Differential induction of glucose-regulated and heat shock proteins: effects of pH and sulfhydryl-reducing agents on chicken embryo cells" *J.Cell Physiol.* **125**:251-258.
- Wickner, S., Hoskins, J. y McKenney, K. (1991) "Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA" *Nature* **350**:165-167.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. y Jakob, U. (1992) "Hsp90 chaperones protein folding in vitro" *Nature* **358**:169-170.
- Williams, N. y Coleman, P.S. (1982) "Exploring the adenine nucleotide binding sites on mitochondrial F1-ATPase with a new photoaffinity probe, 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosine 5'-triphosphate" *J.Biol.Chem.* **257**:2834-41.
- Witte, C., Jensen, R.E., Yaffe, M.P. y Schatz, G. (1988) "MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease" *EMBO J.* **7**:1439-1447.
- Woese, C.R., Gibson, J. y Fox, G.E. (1980) "Do genealogical patterns in purple photosynthetic bacteria reflect interspecific gene transfer?" *Nature* **283**:212-214.
- Woodland, H.R. y Adamson, E.D. (1977) "The synthesis and storage of histones during the oogenesis of *Xenopus laevis*" *Dev.Biol.* **57**:118-135.
- Woovetang, E.J., Wanders, R.J.A., Schutgens, R.B.H., Berden, J.A. y Tager, J.M. (1990) "Properties of the ATPase activity associated with peroxisome-enriched fractions from rat liver: comparison with mitochondrial FOF1-ATPase" *Biochim.Biophys.Acta* **1035**:6-11.
- Wu, F.S., Park, Y.C., Roufa, D. y Martonosi, A. (1981) "Selective stimulation of the synthesis of an 80,000-dalton protein by calcium ionophores" *J.Biol.Chem.* **256**:5309-5312.
- Wynn, R.M., Davie, J.R., Cox, R.P. y Chuang, D.T. (1992) "Chaperonins groEL and groES promote assembly of heterotetramers (a 2 β 2) of mammalian mitochondrial branched-chain α -keto acid decarboxylase in *Escherichia coli*" *J.Biol.Chem.* **267**:12400-12403.
- Yaffe, M.P., farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L. y Sternlicht, H. (1992) "TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis" *Nature* **358**:245:245-248.
- Yaffe, M.P. y Schatz, G. (1984) "Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**:4819-4823.
- Yalovsky, S., Paulsen, H., Michaeli, D., Chtnis, P.R. y Nechushtai, R. (1992) "Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**:5616-5619.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. y Woese, C.R. (1985) "Mitochondrial origins" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**:4443-4447.
- Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W. y Schatz, G. (1988) "Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes" *EMBO J.* **7**:3857-3862.
- Yi, P.N. (1979) "Cellular ion content changes during and after hyperthermia" *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **91**:177-82.
- Yoshida, M., Allison, W.S., Esch, F.S. y Futai, M. (1982) "The specificity of carboxyl group modification during the inactivation of the *Escherichia coli* F1-ATPase with dicyclohexyl [14C]carbodiimide" *J.Biol.Chem.* **257**:10033-10037.
- Yost, H.J. y Lindquist, S. (1986) "RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis" *Cell* **45**:185-193.
- Young, D., Iathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D. y Young, R.A. (1988) "Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:4267-4270.
- Young, D.B. (1990) "Chaperonins and the immune response" *Sem.Cell Biol.* **1**:27-35.
- Zara, V., Palmieri, F., Mahlke, K. y Pfanner, N. (1992) "The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import" *J.Biol.Chem.* **267**:12077-12081.

- Zhi, W., Landry, S.J., Gierasch, L.M. y Srere, P.A. (1992) "Renaturation of citrate synthase: Influence of denaturant and folding assistants" *Protein Sci.* **1**:522-529.
- Zhuang, Z. y McCauley, R. (1989) "Ubiquitin is involved in the *in vitro* insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes" *J.Biol.Chem.* **264**:14594-14597.
- Zillig, W. (1987) "Eukaryotic traits in Archaeobacteria. Could the eukaryotic cytoplasm have arisen from archaeobacterial origin?" *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **503**:78-82.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M.J. y Pelham, H.R. (1988) "Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes" *EMBO J.* **7**:2875-2880.
- Zimniak, L., Dittrich, P., Gogarten, J.P., Kibak, H. y Taiz, L. (1988) "The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H⁺-ATPase. Homology to the β -chain of FOF1-ATPases" *J.Biol.Chem.* **263**:9102-9112.
- Zweig, M. y Cummings, D.J. (1973) "Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein" *J.Mol.Biol.* **80**:505-518.
- Zwizinski, C., Schleyer, M. y Neupert, W. (1984) "Proteinaceous receptors for the import of mitochondrial precursor proteins" *J.Biol.Chem.* **259**:7850-7856.
- Zylicz, M., Ang, D. y Georgopoulos, C. (1987) "The *grpE* protein of *Escherichia coli*. Purification and properties" *J.Biol.Chem.* **262**:17437-17442.
- Zylicz, M., Lebowitz, J.H., McMaken, R. y Georgopoulos, C. (1983) "The *dnaK* protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an *in vitro* DNA replication system" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**:6431-6435.

2. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

El trabajo presentado en esta Memoria se engloba dentro de las aproximaciones experimentales de la Línea de Investigación del Centro de Biología Molecular que tiene como objetivo general el estudio de los mecanismos moleculares y señales biológicas responsables de la biogénesis mitocondrial en mamíferos.

El estudio de la biogénesis mitocondrial en mamíferos tiene una gran relevancia desde el punto de vista básico y clínico, puesto que permite la caracterización de un proceso de vital importancia para comprender el funcionamiento de la célula eucariota y su patología, a la vez que puede contribuir a desentrañar las pautas y los niveles de coordinación en la expresión de los dos genomas que caracterizan a estos tipos celulares. Por otro lado, aunque el estudio de eucariotas superiores de momento no permite realizar una aproximación experimental de genética molecular y clásica, como ocurre en el caso de los eucariotas inferiores (*S.cerevisiae*), factor decisivo a la hora de explicar el desconocimiento que actualmente se tiene sobre este proceso en mamíferos, resulta obvia la necesidad del desarrollo de sistemas experimentales en estos tipos celulares que permitan la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la biogénesis mitocondrial. Evidentemente, las diferencias existentes a este nivel entre eucariotas superiores e inferiores (grado de compactación y contenido génico del genoma mitocondrial, presencia en eucariotas superiores de señales neurohormonales que controlen el proceso, existencia de isoformas proteicas, etc.) no permiten extrapolar nuestro conocimiento actual en el campo de la levadura para el caso de los mamíferos. En este sentido, el estudio de la actividad mitocondrial durante el desarrollo del hígado de rata ha demostrado ser un modelo experimental idóneo, en muchos aspectos, para la caracterización de los mecanismos que controlan el proceso de biogénesis mitocondrial en mamíferos.

En concreto, el estudio de la biogénesis mitocondrial en mamíferos debe contemplar una sucesión de procesos altamente coordinados que incluyen la transcripción de los genes nucleares y mitocondriales, la traducción de los mensajeros correspondientes en cada uno de los compartimentos celulares mencionados, la estabilización de los precursores proteicos en el citosol, su importación al interior de la mitocondria y su maduración, plegamiento y, en el caso de proteínas oligoméricas, su ensamblaje con otras proteínas, momento en el que confluye la expresión de los dos genomas que contribuyen a la biogénesis mitocondrial. Una representación esquemática de los distintos procesos anteriormente citados se incluye en la figura 2.1.

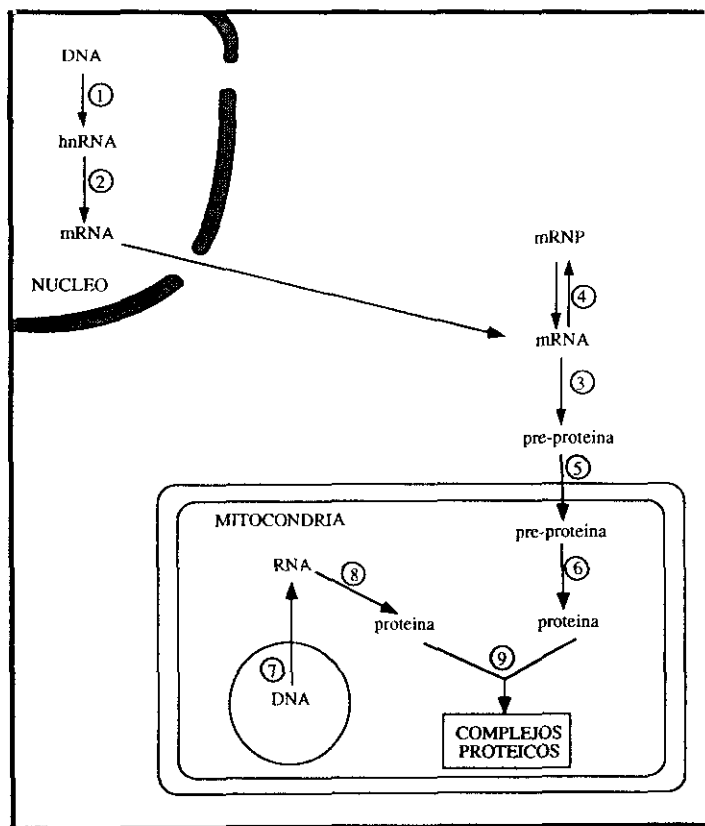


FIGURA 2.1. Representación esquemática de los procesos moleculares implicados en la biogénesis mitocondrial. La transcripción del DNA nuclear (1) genera el transcrito primario o RNA heterogéneo nuclear, cuyo procesamiento ("splicing") (2) da lugar al mensajero maduro, que se exporta al citosol donde puede almacenarse en forma trasduccionalmente inactiva (4) o bien incorporarse a la maquinaria traduccional (3) para dar lugar al precursor proteico. Posteriormente, este es importado a la mitocondria (5) donde sufre el procesamiento proteolítico y eliminación de la presecuencia (6). Por otro lado, el genoma mitocondrial se transcribe (7) y traduce (8) para generar los distintos polipéptidos que pasan a formar parte, junto con las proteínas codificadas en el genoma nuclear, de los complejos proteicos mitocondriales (9), proceso este en el que intervienen distintos chaperones moleculares y que requiere de la hidrólisis de ATP.

La biogénesis mitocondrial en el hígado de rata durante el desarrollo postnatal resulta de dos procesos claramente diferenciados en cuanto a su ocurrencia temporal, aunque no necesariamente distintos en cuanto a los mecanismos que lo controlan. Por un lado, hay que considerar la proliferación mitocondrial, o aumento en el número de orgánulos por célula, un proceso continuo que abarca todo el periodo del desarrollo (Aprille, 1986; Cuezva y col., 1990) y, por otro lado, la diferenciación mitocondrial, consistente en la adquisición de las características ultraestructurales, funcionales y moleculares que garantizan la plena funcionalidad del orgánulo (Valcarce y col., 1988; Cuezva y col., 1990; 1993). Este proceso, a diferencia del anterior, sucede en el hígado de rata exclusivamente durante la primera hora de vida postnatal. Precisamente por la celeridad con que tiene lugar el proceso de diferenciación mitocondrial, es por lo que constituye un buen sistema experimental para analizar los mecanismos, factores y señales

biológicas que controlan la biogénesis mitocondrial en mamíferos. El proceso de diferenciación mitocondrial no es exclusivo del hígado en ese momento del desarrollo, puesto que también se produce en el tejido adiposo marrón (Luis y Cuezva, 1989). La diferenciación mitocondrial en hígado de rata se produce por la acción sinérgica de dos procesos: (i) un rápido aumento postnatal en las velocidades de síntesis de polipéptidos mitocondriales implicados tanto en funciones bioenergéticas (Valcarce y col., 1988; Izquierdo y col., 1990) como metabólicas (Serrano y col., 1989; Cuezva y col., 1993) del orgánulo y (ii) el aumento postnatal en las concentraciones intramitocondriales de nucleótidos de adenina (Valcarce y col., 1988; Aprille y Asimakis, 1980). Este último proceso, independiente de la síntesis proteica (Cuezva y col., 1990), es el responsable de los cambios ultraestructurales que acontecen en el orgánulo durante la primera hora de vida y contribuye al aumento en la eficacia del acoplamiento energético entre respiración y fosforilación oxidativa, por disminuir la permeabilidad pasiva a protones de la membrana interna mitocondrial (Valcarce y col., 1990) a consecuencia de los cambios conformacionales que éstos producen en el translocador de nucleótidos de adenina (Valcarce y col., 1992).

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio en los últimos años se han centrado muy especialmente en el estudio de la biogénesis mitocondrial en cuanto a los mecanismos de regulación de la transcripción y traducción de los genes nucleares implicados en la biogénesis mitocondrial (etapas 1, 2 y 3 en esquema 2.1), y sólo más recientemente se han abordado aspectos relacionados con la expresión del genoma mitocondrial (Ostronoff y col., en prensa). Los primeros estudios realizados en este campo pusieron de manifiesto como durante la primera hora de vida se produce en las mitocondrias de hígado de rata un aumento generalizado en la actividad específica de todos los complejos de la cadena de electrones y de la fosforilación oxidativa (Valcarce y col., 1988), como resultado de un aumento generalizado en las velocidades de síntesis de proteínas mitocondriales (Valcarce y col., 1988). Cuando se estudió la expresión de β -F1-ATPasa, proteína elegida como marcadora del proceso de diferenciación mitocondrial, se observó como la cantidad de esta proteína se duplica durante la primera hora de vida postnatal (Valcarce y col., 1988; Izquierdo y col., 1990), mientras que los niveles estacionarios del mRNA para esta proteína no sufrían cambios en ese mismo periodo del desarrollo (Izquierdo y col., 1990), lo que implica que la diferenciación postnatal de la mitocondria se encuentra regulada a nivel traduccional en el hígado de rata. Posteriormente, se han podido identificar algunos de los niveles de regulación traduccional de la biogénesis mitocondrial del hígado de rata (Luis y col., 1993). Esta regulación parece tener un componente general de activación de la maquinaria

traduccional mediada por modificaciones covalentes de los factores proteicos implicados en dicha etapa (Luis y col., 1993) y que serían los responsables del aumento generalizado en la síntesis de proteínas hepáticas al que antes aludíamos (Valcarce y col., 1988), así como un componente específico de activación para la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear, que incluye, al menos para β -F1-ATPasa (i) la regulación transcripcional y/o post-transcripcional de la disponibilidad del mensajero, al menos mediante su almacenamiento en partículas de alta densidad aparentemente inactivas para la traducción (etapa 4 en esquema 2.1) (Luis y col., 1993) y (ii) la existencia de alguna característica, ya sea intrínseca al mismo o característica de la población de RNAs poliadenilados existentes en este momento del desarrollo, que los hacen más eficientes para su traducción en el citosol, tanto in vivo (Valcarce y col., 1988) como en un sistema in vitro (etapa 3 en esquema 2.1) (Luis y col., 1993).

La bondad del sistema experimental empleado para el estudio de la biogénesis mitocondrial queda puesta de manifiesto al habernos permitido identificar algunas de las señales biológicas implicadas en dicho proceso. En concreto, mediante el desarrollo de un modelo de hipotiroidismo congénito en nuestro sistema experimental, hemos demostrado *la implicación de las hormonas tiroideas en la regulación de la biogénesis mitocondrial en este momento del desarrollo* (Izquierdo y col., 1990). En este sentido, cuando se analiza *la expresión del gen correspondiente a la proteína marcadora β -F1-ATPasa*, se observa que tanto la cantidad de proteína como la del mensajero correspondiente se encuentran significativamente disminuidos en neonatos hipotiroideos (Izquierdo y col., 1990), lo que sugería un efecto de las hormonas tiroideas sobre la transcripción basal del gen de β -F1-ATPasa (etapas 1 y 2 en la fig. 2.1). En efecto, la determinación en ensayos "run-on" de las velocidades de transcripción del gen de β -F1-ATPasa en núcleos aislados de animales hipotiroideos demuestra que esta se encuentra muy disminuida con respecto a los animales controles, y que la administración de hormonas tiroideas en el momento del nacimiento permite recuperar los niveles basales de transcripción (Izquierdo y Cuezva, enviado), demostrando así de forma concluyente la participación de estas hormonas en la transcripción basal, ya sea directa o indirecta, de los genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Por otro lado, el estudio de la expresión del genoma mitocondrial (etapas 6 y 7 en fig. 2.1) en este mismo sistema experimental revela que los niveles estacionarios de mRNAs mitocondriales no sufren cambios durante esta etapa del desarrollo, lo que sugiere un mecanismo de regulación traduccional para la expresión de este genoma (Ostronoff y col., 1993; Ostronoff y col. en preparación). De hecho, la cuantificación de las velocidades de síntesis proteica en orgánulos aislados demuestra como éstas sufren un aumento de 2 a 3 veces en esta etapa del desarrollo. Todos estos

resultados demuestran la existencia de niveles de regulación semejantes para la expresión de los dos genomas involucrados en la biogénesis mitocondrial de la célula eucariota superior, lo que parece indicar que el control de la coordinación de la expresión de ambos sistemas génicos quizá dependa de señales únicas que afecten a mecanismos moleculares análogos.

Resulta evidente a la vista de la actividad investigadora realizada en nuestro laboratorio en los últimos años que en el estudio del proceso de biogénesis mitocondrial de mamíferos quedaban por abordar aquellos aspectos que ocurren de forma post-traducciona en la biogénesis, y que en el caso de eucariotas inferiores, se han desarrollado de forma vertiginosa en los últimos años. Nos referimos concretamente a los procesos de importación, procesamiento y ensamblaje de los componentes proteicos que definen la función mitocondrial. Es precisamente en este contexto y como primera aproximación de este grupo donde se encuadran los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral.

Una de las etapas clave en el proceso de biogénesis mitocondrial lo constituye el plegamiento y ensamblaje de los polipéptidos mitocondriales recién importados (etapa 9 en fig. 3.1). Este proceso, que parece ocurrir de forma espontánea *in vitro*, se encuentra enormemente facilitado *in vivo* por la existencia de un conjunto de polipéptidos denominados chaperones moleculares y que, en el interior de la mitocondria, se encuentran representados por una subfamilia de proteínas característica de este orgánulo, de cloroplastos y de células procariotas, conocidas genéricamente como chaperoninas (ver Revisión Bibliográfica). En este sentido, una serie de resultados que se detallan a continuación hizo enfocar parte de los objetivos de esta Tesis al análisis estructural y funcional de una proteína mitocondrial, la subunidad α del complejo F1-ATPasa, de la que en la actualidad se sabe que desempeña un papel de chaperonina en este orgánulo.

Inicialmente, nuestro grupo identificó, en base a inmunoreactividad y migración electroforética, la presencia de la subunidad α en la matriz de los peroxisomas de hígado de rata (Cuezva y col., 1990). Esta sorprendente localización para esta proteína, que además contenía una secuencia de "targeting" peroxisomal, nos hizo sospechar de la existencia de una actividad funcional adicional a su ya conocida implicación en la fosforilación oxidativa. La existencia de proteínas mitocondriales con doble función no es un hecho sorprendente, puesto que en los últimos años se han descrito varias proteínas mitocondriales implicadas tanto en la biogénesis como en la función de este orgánulo (Braun y col., 1992; Sackmann y col., 1991; Bousquet y col., 1991; Schulte y col.,

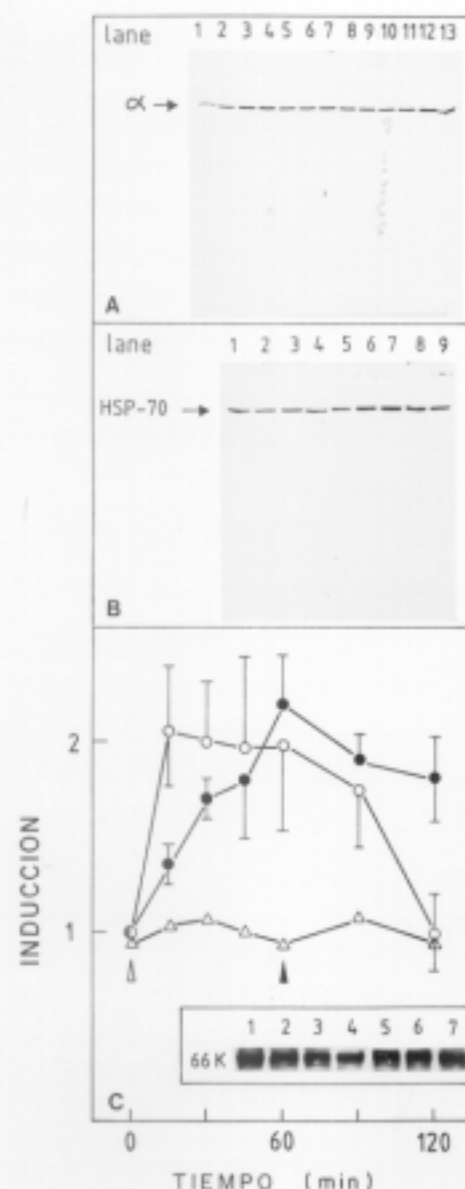


FIGURA 2.2. Inducción de α -F1-ATPasa y hsp70 en larvas de *Drosophila* en respuesta a choque térmico. A. Immunoblot representativo de la inducción de la subunidad α del complejo F1-ATPasa a los siguientes tiempos tras el inicio del choque térmico: 0 (carriles 1 y 2), 15 (carriles 3 y 4), 45 (carriles 7 y 8), 60 (carriles 9 y 10), 90 (carriles 11 y 12) y 120 (carril 13) minutos. B. Immunoblot representativo de la inducción de hsp-70 a distintos tiempos de tratamiento: 0 (carriles 1 y 2), 15 (carriles 3 y 4), 30 (carril 5), 45 (carril 6), 60 (carril 7), 90 (carril 8) y 129 (carril 9) minutos. C. Cuantificación mediante densitometría láser de 3 experimentos distintos, similares a los mostrados en A y B, de la inducción de la subunidad α (círculos abiertos) y hsp70 (círculos cerrados). Los triángulos abiertos muestran la cuantificación de la expresión de una proteína mitocondrial de 66 kDa a distintos tiempos del tratamiento de choque térmico en larvas de *Drosophila*. Para cada blot, el volumen integrado medio de los puntos a 0 minutos se tomó como referencia. Los resultados mostrados son medias \pm error estándar. Las cabezas de flecha abiertas a 0 minutos y cerradas a 60 minutos indican el inicio y el final del tratamiento de choque térmico, respectivamente. Inserto, immunoblot de la proteína mitocondrial de 66 kDa a los siguientes tiempos de iniciarse el choque térmico: 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos para los carriles 1 a 7 respectivamente. Reproducido de Luis y col., (1990).

1989). La doble localización subcelular de α -F1-ATPasa en el hígado de rata y su posible función de chaperón molecular en ambas localizaciones, nos llevó a investigar si esta proteína cumplía una de las características comunes a la mayoría de los chaperones moleculares, esto es, la capacidad de inducirse en respuesta a choque térmico. Concretamente, empleando el modelo experimental de larvas de *Drosophila*, pudimos observar mediante "Western blot" como un único polipéptido de 57 kDa (Fig. 2.2) se inducía en respuesta a tratamiento de choque térmico (Luis y col., 1990). La cantidad de α -F1-ATPasa en las larvas de *Drosophila* se duplicaba tras 15 minutos de tratamiento hipertérmico para volver a recuperar su expresión basal 60 minutos tras la finalización de la exposición hipertérmica (Fig. 2.2). La cuantificación de hsp70 en las mismas muestras reveló un grado de inducción semejante pero con una cinética de inducción considerablemente distinta (fig. 3.2), puesto que requería de 45 minutos de choque térmico para alcanzar su nivel máximo de expresión. El grado de inducción encontrado para α -F1-ATPasa en respuesta a choque térmico era muy semejante al descrito para la chaperonina mitocondrial hsp60 (2-3 veces), tanto en levadura (Reading y col., 1989) como en *Tetrahymena thermophila* (McMullin y hallberg, 1987) y ligeramente distinto para chaperoninas de otros orígenes (4-5 veces para GroEL (Neidhart y col., 1981) e inducción casi imperceptible para RBSP (Hemmingsen y col., 1990)). Estos resultados quedaron realzados por la existencia de evidentes homologías entre las secuencias de ambas familias proteicas (chaperoninas y subunidades α), lo que constituye el punto de arranque de esta Tesis y los que dio lugar a un importante bloque de resultados que se describen en las secciones 5.1.1 a 5.1.5. La hipótesis propuesta por nuestro grupo (Luis y col., 1991) sobre el posible papel chaperonina de la subunidad α no sólo se encuentra apoyada por todo el conjunto de resultados presentados en esta Memoria, sino que, en el curso de la realización de este trabajo, dos laboratorios han proporcionado de forma independiente, evidencias concluyentes al respecto (Avni y col., 1991; Yuan y Douglas, 1992).

Avni y col. (1991) observaron como cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* de los que se había eliminado la subunidad β del complejo F1-ATPasa mediante extracción con LiCl podían ser reactivados tras la adición de subunidades β -F1-ATPasa aisladas de cloroplastos de tabaco y espinacas sólo cuando en el medio existían simultáneamente cantidades catalíticas (5%) de subunidades α procedentes de complejos F1-ATPasa de cloroplastos de espinaca o lechuga (Fig. 2.3). La ausencia de α -F1-ATPasa en dicho ensayo de reconstitución heterólogo no impedía la unión de subunidades β aisladas a los cromatóforos carentes de subunidad β , pero si evitaba la recuperación de la

actividad ATPasa (Avital y col., 1991). Aunque las subunidades α de cloroplastos eran aportadas al ensayo en forma de dímeros α/β , el efecto observado era específico de la subunidad α , puesto que cantidades similares de subunidad β aislada eran incapaces de promover la recuperación de la actividad ATPasa (Avni y col., 1991). En definitiva, Avni y col. (1991) demostraron, por medio de un ensayo heterólogo de reconstitución actividad ATPasa de cromatóforos de *R.rubrum*, como la subunidad α , en cantidades catalíticas, era capaz de facilitar el correcto plegamiento y/o ensamblaje de subunidades β aisladas en cromatóforos carentes de dicha subunidad (Fig. 2.3), actividad ésta característica de chaperones moleculares.

De forma independiente, Yuan y Douglas (1992), haciendo uso de cepas mutantes de *S.cerevisiae* que presentaban deleciones en los genes codificantes para la subunidad α , para la subunidad β o para ambas simultáneamente, pudieron observar como los mutantes

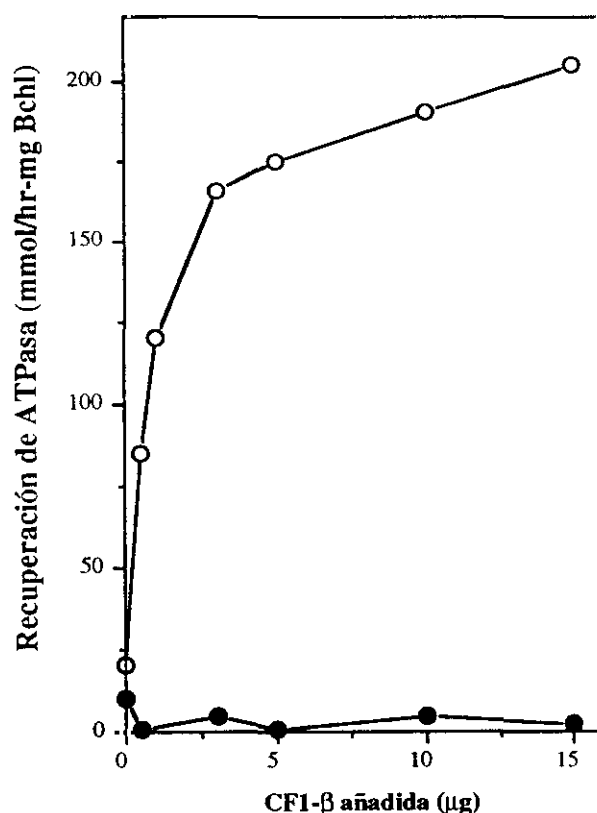


FIGURA 2.3. Efecto de cantidades catalíticas de dímero $\alpha\beta$ de de complejos F1-ATPasa de cloroplastos sobre la capacidad reconstituyente de la actividad ATPasa en cromatóforos de *R.rubrum* carentes de subunidad β . El ensayo heterólogo de reconstitución se llevó a cabo incubando cromatóforos de *R.rubrum* carentes de la subunidad β preparados mediante tratamiento con LiCl (4 μ g de bacterioclorofila) y las cantidades indicadas en abscisas de subunidades β aisladas de cloroplastos de espinaca, en presencia (círculos abiertos) o ausencia (círculos cerrados) de 0,4 μ g de dímeros $\alpha\beta$ de cloroplastos de espinaca (tomado de Avni y col., 1991).

de delección de la subunidad α presentaban velocidades de crecimiento en fuentes fermentables de carbono considerablemente menores a las cepas salvajes y a las cepas mutantes de delección de la subunidad β . Por otro lado, la eficiencia en la importación a la mitocondria de determinados precursores proteicos, determinada tanto *in vitro* en células semi-intactas como *in vivo* mediante experimentos de pulso y caza, era considerablemente menor en los mutantes de delección de la subunidad α que en las cepas salvajes o en los mutantes carentes de subunidad β (Fig. 2.4). Así mismo, los dobles mutantes (delección de los genes codificantes para las subunidades α y β) aunque presentaban unas velocidades de crecimiento semejantes a las cepas de tipo salvaje, mostraban una eficiencia en la importación de precursores a la mitocondria intermedia entre las cepas de

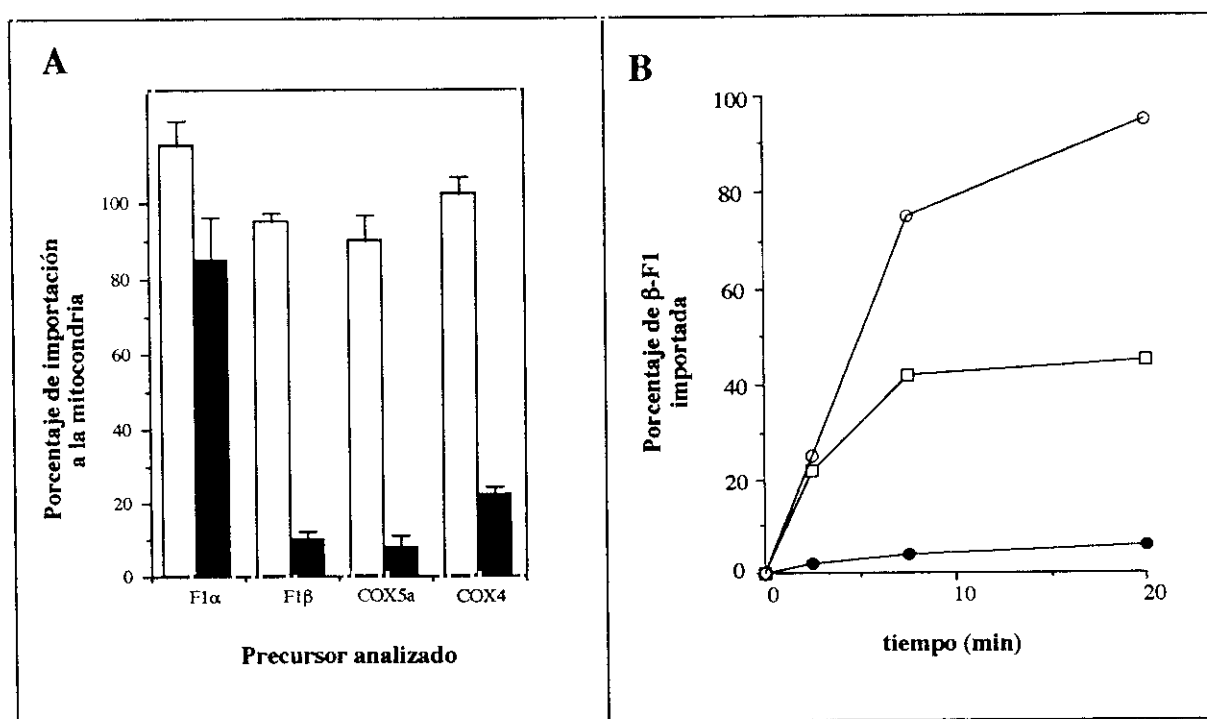


FIGURA 2.4. Efecto diferencial de la delección de los genes codificantes para las subunidades α y β del complejo F1-ATPasa sobre la eficiencia en la importación de distintos precursores mitocondriales. A. Eficiencia de la importación de la subunidades α y β del complejo F1-ATPasa y de las subunidades 4 y 5a de la citocromo oxidasa en mutantes de delección de las subunidades α (columnas abiertas) y β (columnas cerradas). B. Comparación de la eficiencia de la importación a la mitocondria de β -F1-ATPasa en mutantes de delección de las subunidades α (círculos cerrados) y de los dobles mutantes α - β (cuadrados) frente a la cepa salvaje. El ensayo de importación se llevó a cabo incubando los distintos precursores mitocondriales marcados con [35 S]-metionina obtenidos mediante transcripción/traducción *in vitro* en un sistema de lisado de reticulocitos con células de levadura semi-intactas procedentes de mutantes de delección arriba indicados. La eficiencia de la importación se determinó mediante la cuantificación del grado de resistencia a proteasas de los distintos precursores.

tipo salvaje y los mutantes de delección de la subunidad α (Fig. 2.4), aunque significativamente menor que la que presentaba un mutante (Mas70p) de delección del receptor de 70 kDa de la membrana externa mitocondrial (Fig. 2.4). La demostración concluyente de la función de chaperón molecular de la subunidad α del complejo F1-ATPasa permite reinterpretar, al menos parcialmente, algunas evidencias experimentales no justificadas hasta la fecha para esta proteína y para su mensajero. Esta proteína, esencial para la actividad biológica del complejo H^+ -ATP sintasa (Futai y col., 1989; Williams y Coleman, 1982), sufre profundos cambios conformacionales en presencia de ATP, según indican los estudios de la resistencia a proteasas (Senda y col., 1983) y la cuantificación de determinados parámetros físico-químicos (Dunn, 1980) en la proteína purificada en presencia y ausencia de ATP. Esta propiedad parece depender de la unión de ATP a los sitios de unión de nucleótidos de alta afinidad presentes en la subunidades α . Esa propiedad constituye una semejanza notable con la familia de las chaperoninas y, en general, con los chaperones moleculares. Así mismo, otra peculiaridad aparentemente sin explicación, observada para esta proteína lo constituye el que su mRNA se acumula y no se encuentra uniformemente distribuido en el citosol de los oocitos de *Xenopus* (Weeks y Melton, 1987). Esta distribución en gradiente del mensajero de la subunidad α contrasta con la de su producto de traducción, cuya distribución celular coincide, evidentemente, con la de las mitocondrias. El mecanismo y significado biológico de este fenómeno se desconoce por completo.

Ahora bien, debemos resaltar que cuando nos propusimos, como parte de los objetivos de esta Tesis, demostrar la posible ubicuidad de la subunidad α en otros tipos celulares, con el fin de obtener nuevos datos sobre el papel biológico de esta proteína, los resultados obtenidos demostraron de forma concluyente que el polipéptido inmunoreactivo, inicialmente adscrito a la subunidad α del complejo F1-ATPasa, correspondía a la catalasa de hígado de rata. No obstante, aunque el objetivo inicialmente propuesto resultó negativo y no aportó ninguna información adicional sobre las posibles funciones biológicas de la subunidad α , los resultados obtenidos nos han permitido obtener evidencias de la presencia y naturaleza de la catalasa de mitocondria de hígado de rata, una proteína descrita como marcadora exclusiva del peroxisoma en este órgano (de Duve y col., 1965). Estos resultados, por sus posibles implicaciones celulares y funcionales, se describen en las secciones 5.1.6. y 5.1.7.

Otro aspecto de los mecanismos post-traduccionales implicados en la biogénesis mitocondrial, anterior al plegamiento y ensamblaje mediado por chaperones moleculares y

del que la información existente en células de mamíferos es prácticamente inexistente, lo constituye el procesamiento o maduración de los precursores mitocondriales, entendido éste como la eliminación proteolítica intramitocondrial de la secuencia señal que dirige al precursor hacia la mitocondria. La maduración de los precursores mitocondriales mediante la eliminación proteolítica de la secuencia señal (etapa 6 en efig. 3.1) constituye otra de las etapas claves de la biogénesis mitocondrial que hemos abordado. Con este fin, y ante la posibilidad de que este proceso constituya una etapa limitante en el proceso de biogénesis mitocondrial, nos propusimos desarrollar un sistema analítico de alta sensibilidad que permitiera la caracterización inequívoca de los distintos intermedios de procesamiento de los precursores mitocondriales. Este sistema resultará de indudable utilidad para detectar la posible acumulación citosólica de precursores proteicos mitocondriales, algo que puede ocurrir en situaciones de activa biogénesis mitocondrial y/o patologías mitocondriales asociadas a la maquinaria de importación. El desarrollo de esta metodología permitirá, en un futuro muy próximo, el estudio de la variación con el tiempo de la cantidad de precursor y forma madura de los polipéptidos mitocondriales en las distintas situaciones experimentales de biogénesis mitocondrial que estudia nuestro grupo y, eventualmente, la posible caracterización de determinadas patologías mitocondriales ligadas a disfunciones en la maquinaria de importación y procesamiento de los precursores proteicos en líneas celulares de pacientes con mitocondriopatías, aspecto este último que será abordado en colaboración con el laboratorio del Dr. Zeviani (Milán). Los resultados obtenidos en este apartado se describen y discuten conjuntamente en la sección 5.2.

En resumen, los resultados presentados en esta Memoria constituyen la primera aproximación experimental de nuestro grupo de investigación al estudio de los factores y mecanismos que, a nivel post-traducciona, influyen en el proceso de biogénesis mitocondrial de mamíferos. En concreto, se aportan evidencias, por análisis de secuencias y en base a la inmunoreactividad frente a determinados antisueros de la relación evolutiva entre las chaperoninas y la subunidad α del complejo F1-ATPasa. Este análisis ha permitido, por un lado, caracterizar el dominio estructural responsable del reconocimiento molecular de las chaperoninas y subunidades α por sus sustratos. Por otro lado, ha permitido inferir aquellos aminoácidos que posiblemente conforman el centro de unión para nucleótidos de adenina en la molécula de la chaperonina. Así mismo, se ha desarrollado un sistema experimental que permitirá en el futuro la caracterización inequívoca del proceso de maduración de precursores proteicos mitcondriales, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. En otro contexto, hemos demostrado la existencia de catalasa en la mitocondria, aunque esta proteína carece de actividad biológica

en este orgánulo y hemos aportado quizá las primeras evidencias experimentales encaminadas a dilucidar el significado biológico de la presencia de esta proteína en la mitocondria.

3. OBJETIVOS

3.OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

De entre todo el conjunto de procesos moleculares que se suceden de forma coordinada durante la biogénesis mitocondrial, aquellos que ocurren de forma post-traducciona son los que menor atención han recibido en los últimos años, explícitamente en el caso de células de mamíferos. Esto es así, no por resultar en su conjunto menos importantes para la funcionalidad mitocondrial, sino por la falta de un sistema experimental adecuado para su estudio. Por este motivo, resultaba prioritario entre los planteamientos iniciales del trabajo aquí presentado el estudio de dos procesos cuya relevancia para la biogénesis mitocondrial ha sido claramente puesto de manifiesto en células eucariotas inferiores. En concreto, estábamos interesados en la caracterización estructural y funcional de ciertos componentes moleculares de la maquinaria mitocondrial responsable del plegamiento y ensamblaje de los precursores proteicos recién importados y, por otro lado, en desarrollar un sistema analítico que permitiera el estudio del proceso de maduración de los precursores proteicos mitocondriales.

Lógicamente, los objetivos inicialmente planteados fueron abordados de forma simultánea, lo que originó que, en ciertos casos, la obtención de resultados negativos hiciese necesaria la redefinición de alguno de ellos. A continuación se detallan los objetivos generales del trabajo aquí presentado, incluyendo, en cada caso, los objetivos parciales y una somera descripción de los resultados obtenidos para facilitar su comprensión.

En primer lugar, se trató de identificar la existencia de homologías de secuencia entre las chaperoninas y las subunidades α , mediante el análisis comparativo de las correspondientes secuencias proteicas. Así mismo, se intentó determinar la existencia de homologías en la estructura secundaria entre ambas familias proteicas. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de un alto grado de homología a ambos niveles, lo que implica la existencia de un origen evolutivo común y la definición de ciertos módulos proteicos involucrados en actividades/funciones comunes. La existencia de evidentes homologías entre chaperoninas y las subunidades α de las ATPasas de tipo F implica, a su vez, la existencia de homología entre chaperoninas y el resto de las subunidades mayoritarias de las ATPasas de tipo V (A y B) y de tipo F (subunidad beta), ya que se ha propuesto que todas ellas derivan del mismo ancestro. En este sentido se procedió al alineamiento parcial de las secuencias de todas estas familias proteicas con un doble objetivo; por un lado, determinar la posible relación evolutiva entre todas ellas y por otro,

caracterizar los aminoácidos responsables en las chaperoninas del conformar el dominio de unión a nucleótidos.

Con objeto de verificar experimentalmente la existencia de homología estructural entre chaperoninas y subunidades α , se procedió al desarrollo de anticuerpos contra péptidos sintéticos de la subunidad α de hígado de rata en la región de máxima homología con las chaperoninas. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de estos anticuerpos para reconocer proteínas de estrés celular.

Con el fin de analizar la relación estructura-función de los posibles módulos proteicos y aminoácidos comunes entre chaperoninas y subunidades α , se intentó el clonaje molecular del cDNA de la subunidad α de hígado de rata. Los resultados obtenidos fueron negativos.

Puesto que el alineamiento múltiple entre las secuencias de chaperoninas y subunidades α nos permitió proponer regiones conservadas que podrían resultar esenciales para la actividad chaperonina de ambas familias proteicas, se trató de identificar, mediante búsquedas en el banco de datos de secuencias proteicas, la posible existencia de polipéptidos no relacionados con chaperoninas y subunidades α que contuvieran estas secuencias y pudieran aportar información sobre aspectos funcionales comunes. Tras la caracterización y reinterpretación de uno de ellos, y puesto que el abordaje del clonaje molecular había resultado negativo, se procedió al análisis de la relación estructura-función de estos módulos proteicos de la subunidad α en la actividad chaperonina. Para ello, se estudió el efecto de varios péptidos sintéticos sobre los procesos de plegamiento de proteínas desnaturalizadas y sobre la solubilidad de proteínas nativas. Estos resultados nos han permitido definir la región de la cadena polipeptídica de las subunidades α y de las chaperoninas responsable del reconocimiento de sus sustratos en la actividad chaperonina de estas proteínas.

Dada la aparente localización extramitocondrial (en los peroxisomas de hígado de rata) de la subunidad α del complejo F1-ATPasa, nos propusimos identificar la existencia de esta proteína en otras localizaciones celulares que pudieran aportar información sobre la actividad biológica de esta proteína independientemente de su intervención en la fosforilación oxidativa. Esta aproximación nos permitió caracterizar la presencia de material inmunoreactivo en la matriz de los eritrocitos de rata. Sin embargo, cuando se estableció la naturaleza molecular del material inmunoreactivo (p57), común a

mitocondrias, peroxisomas y eritrocitos de rata, mediante técnicas inmunológicas, de mapeo peptídico y microsecuenciación, los resultados indicaron que dicha proteína era catalasa. En consecuencia, este resultado se reorientó, por no estar descrita la presencia de catalasa en la mitocondria, hacia la caracterización parcial de la misma en este orgánulo.

Finalmente, se pretendió desarrollar un sistema experimental que permita caracterizar el procesamiento de precursores mitocondriales. Con este objeto, se utilizó el sistema de electroforesis bidimensional que ilustra experimentalmente las modificaciones en peso molecular y punto isoeléctrico que se producen en dichos precursores tras la eliminación de la secuencia señal. Este sistema permitirá la caracterización inequívoca de algunos precursores proteicos y permitirá en el futuro el análisis molecular de los mecanismos y disfunciones de la maquinaria de importación que pudieran ocurrir durante la biogénesis mitocondrial de mamíferos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. MATERIALES

4.1.1. Animales de experimentación, líneas celulares y cepas bacterianas.

4.1.1.1. *Ratas*.

Se emplearon ratas albinas de la raza Wistar de peso comprendido entre 250 y 300 gr. Los animales han sido criados en el animalario del Centro de Biología Molecular en celdas estancas dotadas de ventilación por cámara de aire de 15 renovaciones por minuto y un ciclo luz-oscuridad de 12 horas con la fase de oscuridad entre las 20:00 horas y las 8:00 horas del día siguiente. La humedad ha oscilado entre el 45-50% y la temperatura entre 22-24 °C. Los animales han sido alimentados con una dieta estándar de laboratorio (23.5% proteínas, 5% lípidos, 49.8% glúcidos, 4% celulosa, 5.7 % sales minerales, 12% agua y vitaminas) y han tenido en todo momento libre acceso a la dieta y agua de bebida.

4.1.1.2. *Conejos*.

Se han utilizado conejos hembras de la raza New Zealand.

4.1.1.3. *Drosophila*.

Se han empleado larvas de las especies *Drosophila hydei* y *Drosophila melanogaster*. Todas ellas se encontraban en la mitad del tercer estadio del desarrollo. El crecimiento de las larvas se llevó a cabo en botellas que contenían 50 ml del medio nutritivo compuesto por: 7.5% azúcar moreno, 10% levadura, 1.1% agar, 5% harina y 0.5% ácido propiónico.

4.1.1.4. *Líneas celulares*.

Se han empleado las líneas celulares establecidas NRK (Normal Rat Kidney fibroblasts, ATCC-CRL 1570) y C9 (hígado de rata, ATCC-CRL 1439). El cultivo de estas células se efectuó con DMEM suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, glutamina 2 mM, amino ácidos no esenciales (Ala, Asn, Asp, Glu, y Pro 400 µM,), penicilina 0.6% y estreptomycin 1%.

4.1.1.5. *Cepas bacterianas*.

Se han empleado *Escherichia coli* de las cepas bacterianas XL1-Blue (Stratagene) y DH5 α (BRL). El cultivo de estas cepas en medio líquido se efectuó en medio LB (Bactotripton 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). El cultivo en placa se efectuó suplementando el medio LB con agar al 1.5% (p/v). En ambos casos se incluyó ampicilina a 50 μ g/ml para la selección de transformantes.

4.1.1.6. *Vectores de clonación.*

Se emplearon los vectores plasmídicos Bluescript (Stratagene) y pUC18 y el vector fágico λ gt11.

4.1.2. **Productos.**

Los reactivos comunes fueron de grado analítico y se emplearon sin previa purificación.

Los productos ATP, GTP, CTP, UTP, EDTA, EGTA, PPO, dimetil-POPOP, Tris, Hepes, Tritón X-100, manitol, DTT, Azida sódica, 4-cloro- α -naftol, Pipes, SDS, β -mercaptoetanol, sarcosil, la tripsina de pancreas bovino, la N-cloro succinimida, los adyuvantes completo e incompleto de Freund y los inhibidores de proteasas (excepto PMSF) fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (Estados Unidos).

Los cloruros sódico, potásico, magnésico, cálcico, amónico, de cesio y de litio; los hidróxidos sódico y potásico, la sacarosa, el glicerol, los fosfatos potásicos, el acetato amónico, magnésico y sódico, el nitrato de plata, el cloruro de cobre, el permanaganato potásico, el citrato sódico; el vanadato sódico; el sulfato magnésico; el etanol; la glicina; el ácido trifluoroacético, la 8-hidroxi-quinoleína; el formaldehído; la formamida y el TCA fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania).

El citocromo c, el PMSF, la proteasa V8, los marcadores de peso molecular de DNA (λ -HindII y λ -HindIII-EcoRI), la DNA polimerasa I, la DNasaI y la RNasa fueron adquiridos a la marca Boehringer (Mannheim, Alemania).

La acrilamida, la bis-acrilamida y m-cresol fueron adquiridos a Fluka A. G. Chemicals.

Los anfolitos y la proteína A-Sepharosa fueron suministrados por Pharmacia-LKB (Bromma, Suecia).

El ácido acético, el isopropanol, el fenol, el cloroformo, el alcohol isoamílico, el butanol y el metanol fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El acetnitrilo y el metanol de grado HPLC fueron adquiridos a Scharlau.

El azul de Coomassie, los marcadores de peso molecular y el Affi-Gel Hz fueron suministrados por Bio-Rad (Richmond, Estados Unidos).

La leche Molico empleada fue de Nestle (Barcelona, España).

Los productos radiactivos [α - ^{32}P]-CTP y [^{35}S]-Metionina fueron adquiridos en Radiochemical Center (Amersham, Reino Unido).

El lisado de reticulocitos y los marcadores de peso molecular de DNA fueron suministrados por Promega (

La albúmina sérica bovina (fracción V) empleada fue de la firma Armour (Armour Pharmaceutical Company, Illinois, Estados Unidos).

La hemocianina de *Megatura crenulata*, la sulfo-N-hidroxi succinimida y el EDC fue suministrado por Pierce.

Los péptidos sintéticos fueron adquiridos a BIO-synthesis (Denton, Estados Unidos).

Las membranas de PVDF empleadas para la transferencia de proteínas fueron suministradas por Millipore (Bedford, Estados Unidos).

El Nycodenz fue adquirido a Nycomed (Oslo, Noruega).

La bactotriptona, el extracto de levadura y el agar fueron de DIFCO y la agarosa de Hispanagar (Burgos, España).

El agua oxigenada fue adquirida a Foret (Barcelona, España).

4.2. METODOS

4.2.1. Fraccionamiento subcelular del hígado de rata.

4.2.1.1. Preparación de homogenados.

Los animales fueron anestesiados y a continuación se les perfundió el hígado a través de la vena porta con medio de aislamiento (medio A) de composición: sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 y EGTA 1 mM con las siguientes concentraciones de inhibidores de proteasas: benzamidina 100 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 5 mg/ml, cloruro de benzetonio 100 mM y PMSF 10 mM. A continuación, el hígado se extrajo, se pesó, se troceó finamente y se homogeneizó con medio A (relación 1:4 p/v) con un homogeneizador manual vidrio-vidrio tipo Dounce realizándose 5 pases con el émbolo A y 4 pases con el émbolo B. Posteriormente, se centrifugó a 800xg (2.500 rpm en rotor Sorvall SS-34) durante 10 minutos. El sedimento, compuesto por núcleos y células no rotas, se desechó.

4.2.1.2. *Aislamiento de mitocondrias.*

4.2.1.2.1. Mediante centrifugación diferencial.

Las mitocondrias de hígado de rata se aislaron según el método descrito por Schneider (1948), con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Valcarce y col. 1988).

4.2.1.2.2. Mediante gradiente de sacarosa.

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 3 ml del homogeneizado preparado según el apartado 2.2.1.1 mediante centrifugación isopícnica en gradientes de densidad de sacarosa del 24 al 54% (p/p) (volumen = 35ml) a 145000xg (rotor Beckmann VTi50, 42.000 rpm) durante 70 minutos a 4 °C. Los gradientes se fraccionaron desde el fondo del tubo en fracciones de 2 ml. La localización de las mitocondrias se efectuó mediante determinación de la actividad citocromo c oxidasa en una alícuota de cada fracción previamente sometida a 3 ciclos de congelación/descongelación. La fracción con mayor actividad específica citocromo c oxidasa ($d = 1.18 \text{ g/cm}^3$) se diluyó con medio A hasta que la concentración de sacarosa fue de 0.25 M y se centrifugó a 8000xg (8.500 rpm en rotor Sorvall SS-34) durante 10 min a 4 °C, obteniéndose un sedimento de mitocondrias que fue resuspendido en el mínimo volumen de medio A. La densidad de los orgánulos fue determinada teóricamente a partir de los límites de densidad superior e inferior del gradiente, o bien de forma empírica mediante análisis por refractometría de la densidad de las fracciones de un gradiente en blanco procesado en paralelo.

4.2.1.2.3. Mediante gradiente de Nycodenz.

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 2 ml de homogeneizado preparado según el apartado 2.1.1. Para ello, sobre 15 ml de una solución isotónica de Nycodenz al 27.6%(p/v) preparada en Tris-HCl 5mM, KCl 3 mM y EDTA 0.3 mM (densidad 1.15 mg/ml, índice de refracción a 22 °C de 1,3784) se depositaron 2 ml de homogeneizado de hígado. Los tubos se centrifugaron a 96000xg (24.000 rpm en rotor Sorvall SW-27) durante 6 h a 4 °C. Los gradientes se fraccionaron desde el fondo del tubo y el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de medio de dilución de Nycodenz. Se determinó la actividad citocromo c oxidasa y la concentración de proteína en cada fracción. La fracción con mayor actividad específica citocromo c oxidasa se diluyó 10 veces con medio A y se

centrifugó a 8000xg (8.500 rpm en rotor Sorvall SS-34) durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en el mínimo volumen de medio A.

4.2.1.3. *Aislamiento de peroxisomas*

4.2.1.3.1. Mediante gradiente de sacarosa.

Se procedió de forma análoga a lo descrito en el apartado 2.1.2.2. Posteriormente se determinó la actividad catalasa y la concentración de proteína en una alícuota de cada fracción previamente congelada y descongelada 3 veces. Las fracciones que contenían la máxima actividad específica catalasa fueron diluidas con Tris-HCl pH 7.5 hasta una concentración final de sacarosa de 0.25 M. Los peroxisomas fueron recuperados a partir de esas fracciones mediante ultracentrifugación a 105.000xg (40.000 rpm en rotor Beckmann 75 Ti) durante 30 minutos a 4°C o bien mediante precipitación del total de proteínas de la fracción con TCA al 10%.

4.2.1.3.2. Mediante gradiente de Nycodenz.

La preparación de peroxisomas se efectuó de forma semejante a lo descrito en el apartado 4.2.1.2.3 para mitocondrias. Para ello, se determinó la actividad catalasa en cada fracción. De forma totalmente reproducible, el pico de actividad específica catalasa se localizaba en el pellet compacto que fue resuspendido en 100 µl de medio de dilución de Nycodenz.

4.2.1.4. *Fraccionamiento submitocondrial.*

El subfraccionamiento de las mitocondrias se efectuó básicamente según el método descrito por Colbeau y col. (1971).

4.2.1.4.1. Preparación de solubilizado mitocondrial.

Las mitocondrias obtenidas por los métodos descritos en el apartado 4.2.1.2 fueron solubilizadas con Triton X-100 mediante resuspensión del pellet de mitocondrias en 1 ml de tampón fosfato 20 mM pH 7.5, NaCl 0,15M y Triton X-100 1% por cada 0.5 g de tejido hepático de partida. A continuación, el solubilizado fue sometido a 3 ciclos de congelación (con nitrógeno líquido)/descongelación (en baño de agua a 37 °C), incubado durante 30 minutos a 37°C y finalmente centrifugado a 104.000xg (40.000 rpm en

rotor Beckmann 75 Ti) durante 1 h a 4°C. El sobrenadante constituía el solubilizado mitocondrial.

4.2.1.4.2. Obtención de mitoplastos.

Las mitocondrias preparadas mediante centrifugación diferencial (apartado 4.2.1.2.1) o mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (apartado 4.2.1.2.2) fueron sometidas a choque osmótico mediante resuspensión del pellet en 3 ml de fosfato potásico 20 mM pH 7.4 y BSA 0.02% por cada gramo de tejido hepático de partida y posteriormente incubadas durante 20 min a 0 °C con agitación intermitente. Los mitoplastos resultantes fueron sedimentados mediante centrifugación a 13.000xg (10.500 rpm en rotor sorvall SS-34) durante 10 minutos a 4°C.

4.2.1.4.3. Obtención de vesículas de membrana interna mitocondrial.

Los mitoplastos fueron sometidos a choque osmótico mediante incubación en 1.5 ml de fosfato potásico 20 mM pH 7.4 por cada mg de proteína durante 15 minutos a 0°C. A continuación, los mitoplastos fueron vesicularizados con un polítron durante 30 segundos a fuerza 3 y centrifugados a 25.000xg (15.000 rpm en rotor Sorvall SS-34) durante 10 minutos a 4°C. El pellet de vesículas de MIM fue lavado 2 veces mediante resuspensión en fosfato potásico 20 mM pH 7.4 y sedimentación a 25.000xg (15.000 rpm en rotor Sorvall SS-34).

4.2.1.4.4. Purificación parcial del complejo FI-ATPasa.

Se realizó esencialmente según el protocolo propuesto por Beechy y col., (1975) con las modificaciones introducidas por Tyler y Webb (1979). Las vesículas de MIM fueron recogidas mediante ultracentrifugación a 80.000xg (35.000 rpm en rotor 75Ti) y el pellet se resuspendió en medio E, que contenía sacarosa 0.25M, Tris-SO₄ 10 mM y EDTA 5 mM hasta una concentración de proteína de 10 mg/ml. Se añadió ATP hasta una concentración de 100 µM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A la suspensión de MIM se le añadieron lentamente 0.5 vol de cloroformo con agitación constante e inmediatamente fue centrifugada a 1.500xg (3.500 en rotor Sorvall SS-34) durante 10 min a 25°C, recogiendo la fase acuosa superior, que fue centrifugada a 80.000xg (35.000 rpm en rotor 75Ti) durante 45 minutos 22°C para eliminar restos insolubles. El sobrenadante fue distribuido en alícuotas, liofilizado y conservado a -20 °C hasta su utilización.

4.2.1.5. *Preparación de fracción citosólica*

El homogeneizado de hígado de rata preparado según lo descrito en el apartado 2.1.1 fue centrifugado a 8.500xg (8.000 rpm en un rotor Sorvall SS-34) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue de nuevo centrifugado a 105.000xg (40.000 rpm en un rotor Beckmann 75Ti) durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante, que constituía la fracción citosólica, contenía del orden de 15 mg/ml de proteína.

4.2.2 **Preparación de matriz de eritrocitos de rata.**

La fracción de matriz de eritrocitos de rata se obtuvo según el método descrito por Hanahan y col. (1974), con ciertas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio. Sangre heparinizada de rata adulta, obtenida mediante punción de la vena prota del animal anestesiado fue centrifugada a 1.000xg (3.000 rpm en rotor Sorvall SS-34). El sedimento se resuspendió en 20 ml de una solución isotónica de Tris (310 mOsm = 0.172 M pH 7.6) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió 2 veces más. El precipitado de células lavadas, constituido fundamentalmente por eritrocitos se resuspendió en una solución hipotónica de Tris (20 mOsm = 10 mM pH 7.6) en una proporción 1:1 (v/v) y se incubó durante 1 hora a 0°C con agitación intermitente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20.000xg (13.000 rpm en rotor Sorvall SS-34) durante 40 minutos a 4 °C, obteniéndose un precipitado compuesto por la fracción de membrana y un sobrenadante que contenía las proteínas de la matriz del eritrocito, que fue conservada a -20°C. Durante los primeros ciclos de congelación/descongelación se observó de forma constante la formación de agregados proteicos insolubles que fueron separados de la preparación mediante ultracentrifugación a 105.000xg (40.000 rpm en rotor Beckmann 75Ti) durante 1 hora a 4 °C. La adición a la preparación de matriz de NaCl hasta una concentración final de 0.15 M prevenía parcialmente este efecto. La concentración de proteína se determinó con el reactivo de Bradford.

4.2.3 **Tratamiento de choque térmico de larvas de *Drosophila*.**

Para el tratamiento de choque térmico de las larvas de *Drosophila*, grupos de 20 larvas fueron transferidas a una cámara a 37 °C durante 60 minutos. Durante este periodo de tiempo se tomaron muestras a 15, 30, 45 y 60 minutos de iniciado el tratamiento. A

los 60 minutos, los grupos restantes fueron trasladados de nuevo a la cámara de 25 °C y se tomaron muestras a 90 y 120 minutos desde el inicio del tratamiento. Inmediatamente después de tomar cada muestra las larvas fueron congeladas en nitrógeno líquido y convertidas en polvo con la ayuda de un mortero. Al polvo de cada muestra se le añadió un medio que contenía fosfato potásico 20 mM pH 7, NaCl 0.9% y Triton X-100 al 1% en proporción 1:5 (p/v). La suspensión así obtenida se sometió a 3 ciclos de congelación/descongelación y se centrifugó a 15.000 x g (12.000 rpm en microfuga) durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante para su posterior análisis. La concentración de proteína en la muestra se determinó por el método de Bradford.

4.2.4 Determinación de actividades enzimáticas.

4.2.4.1. *Actividad citocromo c oxidasa.*

Se empleó el método descrito por Warton y Tzagaloff (1967), basado en la disminución de densidad óptica a 550 nm durante la oxidación del citocromo c reducido. La reacción se dispara mediante la adición de 25 nmol de citocromo c reducido en un volumen final de cubeta de 1 ml. El coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido a 550 nm es de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.4.2. *Actividad catalasa.*

La determinación de la actividad catalasa se efectuó según el método descrito por Chance y Herbert (1950), basado en la determinación espectrofotométrica de la desaparición de H_2O_2 midiendo a 240 nm. La reacción se inició mediante la adición de 100 μmol de H_2O_2 a la cubeta (volumen final 1ml). El coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno a 240 nm es de $0.00394 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Alternativamente, en las muestras procedentes de gradientes de Nycodenz, la actividad catalasa se determinó mediante el método volumétrico descrito por Feinstein (1949), puesto que el Nycodenz también absorbe a 240 nm. Dicho método se basa en la titulación volumétrica redox con permanganato potásico del H_2O_2 remanente.

4.2.5 Fraccionamiento electroforético de proteínas.

4.2.5.1. *Electroforesis monodimensional en geles de SDS-poliacrilamida.*

Los fraccionamientos de proteínas se realizaron básicamente según el protocolo descrito por Laemmli (1970). El porcentaje de acrilamida empleado en cada caso se indica en los correspondientes pies de figura. La calibración de los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas de peso molecular conocido.

4.2.5.2. *Electroforesis bidimensional*

4.2.5.2.1. Isoelectroenfoque/electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (IEF/SDS-PAGE).

El protocolo usado fue el inicialmente descrito por O'Farrell (1975) con algunas modificaciones (Bravo y col.). La separación en la primera dimensión mediante isoelectroenfoque fue efectuada en geles cilíndricos del 4 % (p/p) de poliacrilamida de 230x2,3 mm o 150x2,3 mm con un 2% de anfolitos (16% pH 5-7, 4% pH 3.5-10). El isoelectroenfoque se llevó a cabo a 1200 V durante 20 h. Una vez finalizado éste, los geles se equilibraron en 5 ml de tampón de composición Tris-HCl 0.06M pH 6.8, SDS 2%, DTT 0.1 M y glicerol 10% durante 10 minutos y se guardaron a -30°C hasta su utilización. El gradiente de pH de los geles de la primera dimensión oscilaba entre 4.4 y 7.5. Para la segunda dimensión, los geles del isoelectroenfoque fueron descongelados y cargados en un gel de poliacrilamida del 15% de 25x25 cm y recubiertos de agarosa al 15% (p/v) disuelta en tampón de equilibrio con un 0.02% de azul de bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente.

4.2.5.2.2. Non-equilibrium pH gradient electrophoresis/electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (NEPHGE/SDS-PAGE).

La separación en la primera dimensión para separar proteínas básicas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por O'Farrell (1977). Los geles empleados fueron del 4% de poliacrilamida y de 150x2.3 mm. La electroforesis se efectuó a 400 V durante 4-5 horas. El fraccionamiento en la segunda dimensión se efectuó de forma análoga a lo descrito en el apartado anterior.

4.2.5.2.3. Visualización de las proteínas fraccionadas.

4.2.5.2.3.1. Tinción con azul de Coomassie.

Los geles mono- o bidimensionales se fijaron en ácido acético 10% (v/v) e isopropanol 25% (v/v) durante 30 minutos y se tiñeron con una solución al 7% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 en metanol 50% (v/v) y acético 7% (v/v). La eliminación del colorante no unido a proteínas se efectuó mediante difusión lenta de éste en acético 10% (v/v) y metanol 25% (v/v).

4.2.5.2.3.2. Tinción con plata

Se siguió el protocolo descrito por Ansorge y col. (1985). La tinción con nitrato de plata se efectuaba directamente después de la electroforesis o bien a partir del gel previamente teñido con Coomassie, en cuyo caso, el gel teñido se incubaba durante un mínimo de 4 horas en metanol al 50% (v/v).

4.2.5.2.3.3. Fluorografía

La detección de proteínas marcadas con emisores β de baja energía (^{35}S) se efectuó mediante fluorografía según el protocolo descrito por Laskey y col. (1975). El gel seco se expuso a una película de rayos X AGFA a -70°C con una pantalla intensificadora Cronex Dupont.

4.2.5.2.3.4. Autoradiografía

Las proteínas marcadas con ^{32}P se visualizaron mediante exposición directa del gel teñido y seco a una película de rayos X a -70°C o a temperatura ambiente.

4.2.6 Generación de anticuerpos

4.2.6.1. *Anticuerpos contra los péptidos sintéticos anti-DR1 y anti-DR2.*

Los péptidos sintéticos DR-1 ($\text{NH}_2\text{-VGLKAPGIIPRI-COOH}$) y DR-2 ($\text{NH}_2\text{-YLHSRLLERAAKM-COOH}$) fueron sintetizados por Biosynthesis Inc. (Denton, USA). La pureza y composición de ambos péptidos fueron verificados por el propio proveedor

mediante HPLC en fase reversa y análisis cuantitativo de composición de aminoácidos, respectivamente. Para la generación de anticuerpos contra ambos péptidos se empleó la hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) como carrier inmunógeno. La conjugación de los péptidos al carrier se efectuó a través de los grupos amino libres empleando sulfo N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) como agente de cross-linking y 1-etil-3 (3-dimetilamino propilcarbodiimida) (EDC) como catalizador del proceso. Los péptidos fueron disueltos en agua a una concentración de 2 mg/ml y se le añadió EDC hasta 50 mM y sulfo-NHS hasta 2 mM. Se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente, ajustando el pH a 7 con NaOH y posteriormente se añadió un volumen de solución de KLH en PBS, de forma que la relación de pesos entre KLH y péptido fuera del orden de 0.22 g péptido por cada g de KLH. La reacción se dejó proceder durante 2 horas a temperatura ambiente y se detuvo mediante adición de acetato sódico pH 4.3 hasta una concentración final de 100 mM. El rendimiento de la reacción de conjugación se determinó mediante fraccionamiento de la mezcla de reacción mediante cromatografía de gel-filtración en Sephadex G-50, empleando PBS como fase móvil (volumen de columna = 10 ml), monitorizando la densidad óptica del eluato a 214 o 280 nm. La aparición de un único pico a ambas longitudes de onda para ambos péptidos indicó una conjugación próxima al 100%. Las fracciones de máxima absorbancia en el UV fueron liofilizadas y empleadas para la inmunización.

El protocolo empleado para la inmunización fue análogo para ambos péptidos. Las mezclas inmunógenas empleadas fueron una emulsión de 500 µg del conjugado péptido-KLH resuspendidos en 250 µl de PBS con 2 volúmenes de adyuvante completo de Freund (para la primera inoculación) o 1 volumen del adyuvante incompleto de Freund (para las sucesivas inoculaciones). La emulsión se formó mediante sonicación (5 pulsos de 15 segundos a 18 micrones de amplitud a intervalos de 15 segundos). La inmunización se efectuó en conejos New Zealand mediante inoculación del antígeno por vía intradérmica (10 inóculos repartidos por toda la superficie dorsal) en la primera inmunización, y por vía subcutánea por el resto de las inmunizaciones. Se efectuaron un total de 8 inoculaciones con 500 µg de conjugado y 15 días antes del sacrificio del animal, se efectuó una última inoculación con 2 mg de conjugado.

El título de los sueros fue determinado de forma periódica cada 15 días. Para ello, cantidades crecientes de los péptidos se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa empleando un aparato de filtración Dot Blot (Bio-Rad, Richmond, Estados Unidos) y se incubaron con distintas diluciones del antisuero. La inmunoreactividad en cada punto de

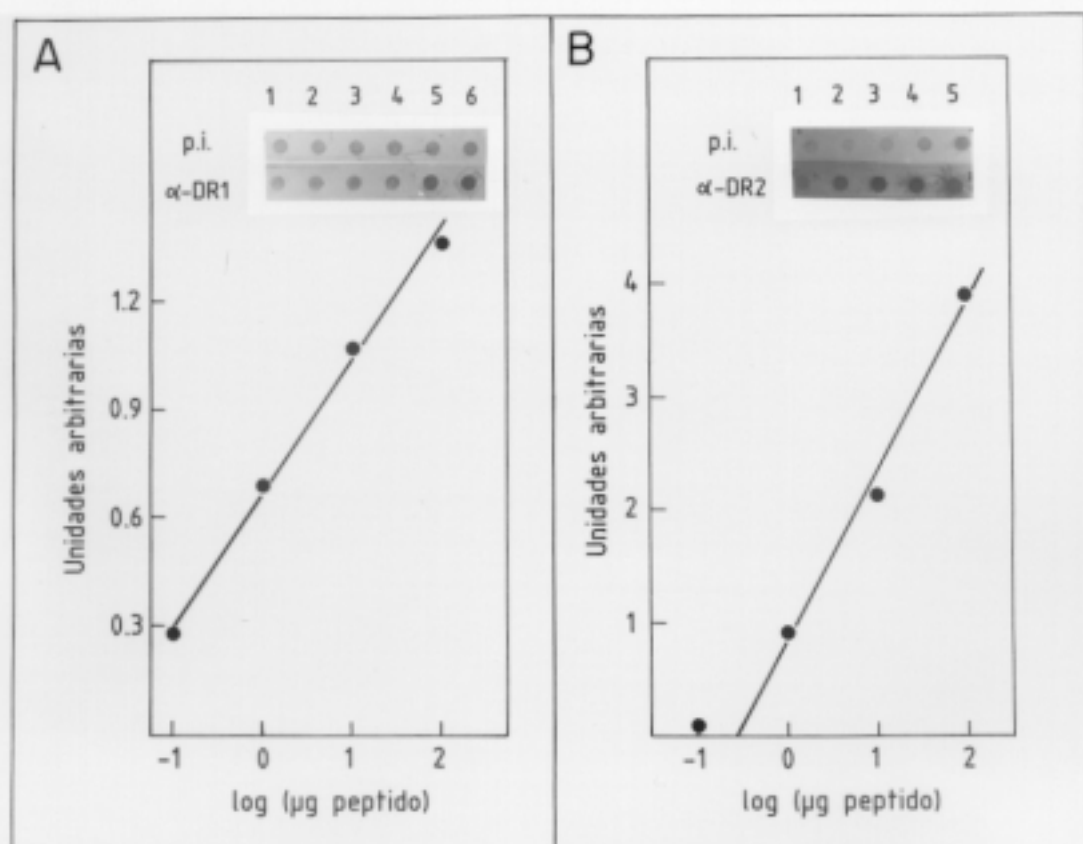


FIGURA 4.1. Titulación de los sueros anti-DR1 y anti-DR2. Se muestran las curvas de titulación obtenidas para los sueros anti-DR1 (panel A) y anti-DR2 (panel B), empleando en ambos casos 0.1, 1, 10 y 100 μg del péptido correspondiente previamente inmovilizado en membranas de PVDF. La relación entre la densidad óptica de la señal inmunoreactiva cuantificada mediante densitometría laser de barrido y el logaritmo de la concentración de péptido aplicada es lineal en ambos casos, estando definidas por los parámetros: $m=0,355$; $b=0,66$ y $r=0,997$ para anti DR-1 y $m=1,3$; $b=1,1$ y $r=0,965$ para anti-DR2. Los insertos muestran la intensidad de la señal inmunoreactiva en un experimento tipo de titulación, en el que se emplearon sueros preinmunes (p.i) o sueros inmunes frente al péptido DR-1 (α -DR1) y DR-2 (α -DR2).

aplicación se visualizó siguiendo un protocolo análogo al de Western blot. La intensidad de la señal inmunoreactiva se determinó mediante densitometría laser (Fig. 4.1).

4.2.6.2. *Anticuerpos contra la proteína de 57 kDa de matriz de eritrocito inmunoprecipitada por el anticuerpo anti F1-ATPasa.*

Los productos resultantes de la inmunoprecipitación de matriz de eritrocito con el anticuerpo anti F1-ATPasa consisten en una banda mayoritaria de aproximadamente 57 kDa (Fig. 4.2). Con el fin de generar anticuerpos contra esta proteína, los productos de inmunoprecipitación se fraccionaron mediante SDS-PAGE en geles del 7.5%. La proteína de interés fue visualizada mediante tinción con Coomassie Blue R-250 y empleada directamente como agente inmunógeno según el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988). Para ello, por cada dosis de antígeno, se recortaron 10 o 12 bandas, correspondientes cada una de ellas a una reacción de inmunoprecipitación directa a partir de 1 mg de proteína de matriz de eritrocito y con 50 μ l del antisuero antiF1-ATPasa. Las bandas fueron liofilizadas y pulverizadas posteriormente con la ayuda de un mortero. Las bandas pulverizadas se hidrataron con agua durante 3 horas con agitación constante y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador manual vidrio-vidrio tipo Dounce. A la mezcla se le añadieron 2 volúmenes de adyuvante completo (primera inoculación) o adyuvante incompleto (sucesivas inoculaciones) y se sonicó a 18 micrones de amplitud con pulsos de 15 segundos hasta la formación de una emulsión estable. La inmunización se realizó según se ha descrito anteriormente. El título del antisuero se monitorizó cada 15 días, llegando éste a su nivel máximo a los 2 meses de comenzar la inmunización. El título del suero fue determinado mediante Western blot de distintas cantidades de proteína de matriz de eritrocito y de mitocondria de hígado de rata (Fig. 4.3) fraccionadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con distintas diluciones del antisuero.

4.2.6.3. *Anticuerpos purificados por afinidad.*

Se empleó el método descrito por Snyder y col., (1987), que permite la obtención de una fracción de IgGs específica para una determinada proteína a partir de un antisuero obtenido contra una mezcla de proteínas. Para ello, la proteína cuyos anticuerpos deseamos enriquecer específicamente es fraccionada mediante geles preparativos de poliacrilamida-SDS, transferida a PVDF e incubada con el anticuerpo poliespecífico durante una noche a temperatura ambiente. La localización inequívoca de la proteína de interés en la membrana se efectuó recortando un carril longitudinal en la membrana e incubando éste posteriormente con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa y visualización de las bandas inmunoreactivas. La región de la membrana de PVDF que

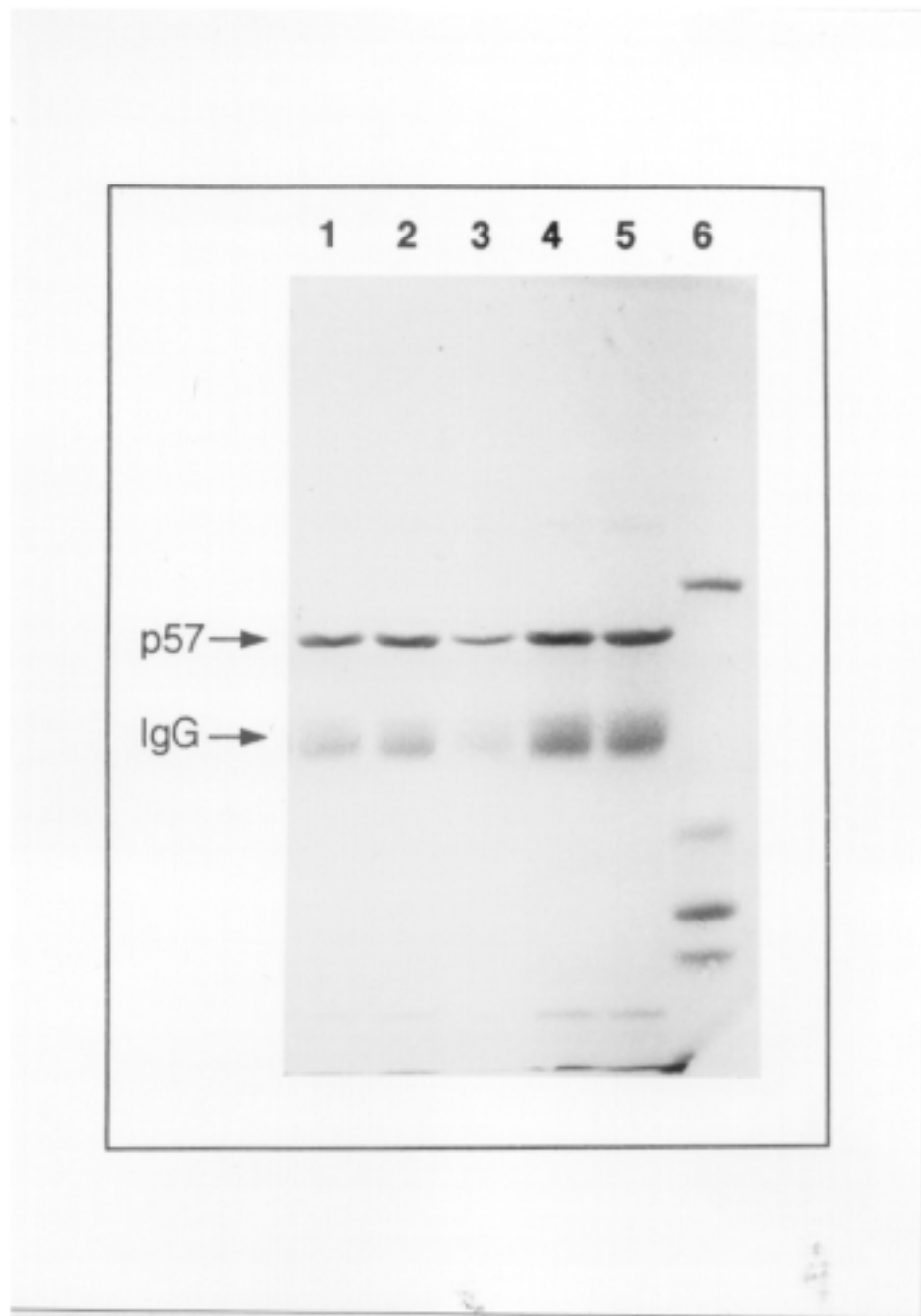


FIGURA 4.2. Experimento representativo de inmunoprecipitación directa preparativa con el anticuerpo anti-F1-ATPasa. La inmunoprecipitación se efectuó a partir de 1 mg de proteína de matriz de eritrocitos de rata (carriles 1 a 5). Los productos resultantes de la inmunoprecipitación se analizaron mediante SDS-PAGE en geles del 7,5% y tinción con Coomassie. Los marcadores de peso molecular empleados (carril 6) corresponden a 66, 45, 36 y 29 kDa. La identidad de los polipéptidos inmunoprecipitados se indica mediante flechas a ambos lados del gel. La banda de mayor peso molecular corresponde a p57. La banda de menor peso molecular corresponde a la cadena pesada de la IgG.

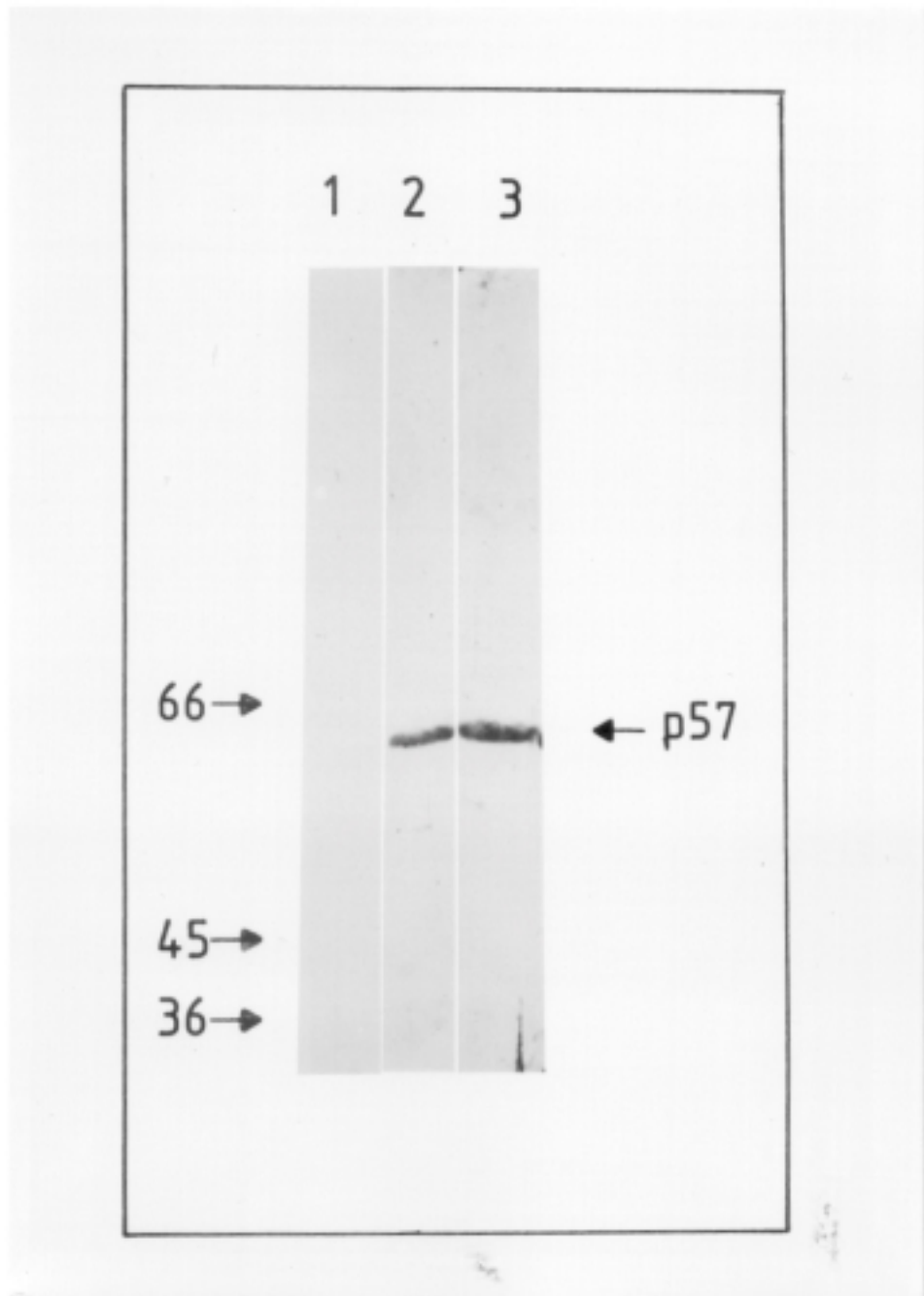


FIGURA 4.3- Titulación mediante "Western blot" del anticuerpo generado contra la proteína de 57 kDa inmunoprecipitada por el anticuerpo anti-F1-ATPasa a partir de matriz de eritrocitos. Se fraccionaron en cada carril 2 mg de proteína de matriz de eritrocitos mediante SDS-PAGE, en geles del 7.5%. Las proteínas se transfirieron posteriormente a PVDF y se incubaron con una dilución 1:100 (v/v) de los antiseros obtenidos a los 0 (carril 1), 30 (carril 2) y 60 días (carril 3) (2 y 4 inoculaciones, respectivamente) de comenzar la inmunización.

contenía la proteína fue lavada con TBS-Molico y a continuación incubada en Gly-HCl 5 mM pH 2.3 durante 90 segundos a temperatura ambiente, con el fin de eluir la fracción de IgGs. EL eluido fue neutralizado inmediatamente con tampón fosfato 1M pH 9 y 10% BSA.

4.2.7 Análisis inmunológico de proteínas.

4.2.7.1. "Western blot"

4.2.7.1.1. Transferencia

Tras el fraccionamiento de las proteínas en geles mono o bidimensionales, éstas fueron transferidas a membranas de PVDF (0.45 μ m de poro) en un equipo de transferencia semi seco Pharmacia-LKB empleando una intensidad de corriente de 1 mA/cm² de superficie del gel. Las transferencias se efectuaron alternativamente en Gly 39 mM, Tris 48 mM, metanol 20% (v/v) y SDS 0.0375% durante 2 horas o bien en CAPS 10 mM pH 11, metanol 10% (V/V) durante 45 minutos, según se indica en los correspondiente pies de figura.

4.2.7.1.2. Inmunodetección

Las membranas fueron bloqueadas con BSA al 3% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. La incubación con el anticuerpo se efectuó durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación. El anticuerpo y la dilución empleados en cada caso se indican en los correspondientes pies de figura. A continuación, las membranas fueron lavadas con TBS-Molico (leche desnatada en polvo al 1% (p/v) en TBS) durante 30 minutos con 3 cambios de medio de lavado. Posteriormente, las membranas se incubaron con una dilución 1:1500 de un anticuerpo de cabra contra la Fc de las IgGs de conejo conjugado a peroxidasa en TBS-Molico. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron mediante incubación de las membranas en Tris-HCl 80 mM pH 7, 4-cloro α -naftol 0.06% (p/v) y H₂O₂ 0.6 mg/ml. La reacción de revelado se detuvo sustituyendo el medio anterior por agua destilada.

4.2.7.2. *Inmunoprecipitación.*

4.2.7.2.1. Inmunoprecipitación directa

Se efectuó esencialmente según el método recientemente descrito por nuestro grupo (Izquierdo y col., 1990). Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo en fosfato 20 mM, NaCl 0.9% y Triton X-100 1% conteniendo solubilizado mitocondrial o matriz de eritocito en cantidades variables según se indica en los correspondientes pies de figura y entre 50 y 100 μ l del antisuero anti F1-ATPasa o suero preinmune. La reacción se dejó proceder durante 1 hora a 37 °C con agitación suave y 3 horas o toda la noche a 4 °C. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron recogidos mediante centrifugación a 15.000 x g (12.000 rpm en microfuga) y lavados con los siguientes medios: fosfato 20 mM pH 7.5, NaCl 0.9% y Triton X-100 0.5 % (2 veces) y fosfato 20 mM pH 7.5 y Triton X-100 0.5% (1 vez). Los complejos inmunes fueron resuspendidos en Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.02% mediante agitación vigorosa, posteriormente calentados a 95 °C durante 5 minutos y fraccionados en geles de poliacrilamida-SDS. Una inmunoprecipitación representativa a partir matriz de eritocitos de rata se muestra en la figura 4.2. Para el análisis de los productos de inmunoprecipitación mediante electroforesis bidimensional, el precipitado resultante se liofilizó y se resuspendió directamente en el tampón de la primera dimensión (urea, NP-40, etc).

4.2.7.2.2. Inmunoprecipitación con proteína A-sepharosa.

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Izquierdo y col. (1990). Para ello, las preparaciones de proteínas mitocondriales, de matriz de eritocito o de peroxisoma (según se especifica en los correspondientes pies de figura) fueron diluidas hasta un volumen final de 1 ml con una concentración final de fosfato 20 mM pH 7.5, NaCl 0.9% y triton X-100 1%. Se añadió a continuación el antisuero correspondiente y se incubó durante 30 minutos a 37 °C y 1 hora a 4 °C con agitación. A continuación se añadieron 20 μ l de una suspensión de proteína A-sepharosa al 50% (v/v) en PBS y se incubó a 4 °C durante 1 hora más. Los complejos antígeno-anticuerpo-proteína A-sepharosa se sedimentaron mediante centrifugación en microfuga durante 10 segundos y fueron lavados sucesivamente con 1 ml de los siguientes medios Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.3 M y Triton X-100 2% (1 vez), Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.5M y Triton X-100 0.1% (1 vez) y Tris-HCl 10 mM pH 8 y Triton X-100 0.05% (1 vez). Tras estos lavados, se añadieron 50 μ l de tampón de ruptura y se calentó a 95 °C durante 5 minutos.

Los productos resultantes se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

4.2.7.3. *Cromatografía de inmunoafinidad*

La purificación de la fracción de IgG de los sueros anti-DR1 y anti-DR2 se llevó a cabo empleando el "Econo-Pac Serum IgG Purification Kit" (Bio-Rad, Richmond, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la conjugación de las IgG a un soporte sólido, empleamos el "Affi-Gel Hz Immunoaffinity Kit" (Bio-Rad, Richmond, Estados Unidos), que permite el acoplamiento covalente de la molécula de IgG a través de su región Fc a un soporte sólido de Affi-Gel. Este método está basado en la generación de restos aldehído reactivos en la molécula de IgG a consecuencia de la oxidación con periodato de los restos glicosilados presentes en la Fc de estas moléculas. Los intermedios así formados pueden reaccionar con un soporte sólido derivatizado con restos de hidrazida. La conjugación de las IgGs de los sueros anti-DR1 y anti-DR2 a Affi-Gel Hz se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor. Los conjugados matriz sólida-IgG fueron empaquetados en columnas de cromatografía de 1 ml de volumen, sobre las que se aplicaron 400 mg de proteína de hígado de rata. A continuación, las columnas se lavaron con 25 volúmenes de PBS con NaCl 0,15 M y con 25 volúmenes de NaCl 0,01 M, hasta estabilización de la densidad óptica a 280 nm del eluato. La elución de las proteínas retenidas se efectuó aplicando a la columna $MgCl_2$ 2,6M hasta que la densidad óptica del eluato a 280 nm volvió a su valor basal. Las fracciones que contenían el pico de densidad óptica fueron dializadas conjuntamente frente a H_2O y liofilizadas.

4.2.8 **Análisis peptídico de proteínas y microsecuenciación**

4.2.8.1. *Digestiones con proteasa V8*

La proteólisis parcial con la proteasa V8 de *S.aureus* se efectuó según el protocolo descrito por Cleveland (1978) para la digestión de proteínas previamente fraccionadas mediante SDS-PAGE. La proteasa V8 rompe específicamente los enlaces peptídicos situados al extremo carboxilo de residuos ácidos. Para ello, la banda que contenía al proteína a analizar se recortó del gel teñido con azul de Coomassie y seco y se rehidrató mediante 3 lavados de 20 minutos con cada uno de los siguientes medios: Tris-HCl 1M pH 8.8, metanol (1:1, v/v) y Tris-HCl 1M pH 8.8, metanol (4:1, v/v), alternando uno y otro. A continuación, se añadieron 40 μ l de tampón de ruptura especial (Tris-HCl 0.125 M pH 8.8, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, glicerol 10% y azul de

bromofenol 0.02%), se trocearon los fragmentos de gel y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, los fragmentos de gel se cargaron en un gel de poliacrilamida del 15%, y en cada pocillo se añadieron las cantidades correspondientes de proteasa V8 (según se indica en los correspondientes pies de figura), diluida en tampón de ruptura especial. A continuación se arrancó la electroforesis a 15 mA por gel hasta que el frente se encontró en la mitad del gel concentrador, momento en el que se detuvo la electroforesis durante un tiempo determinado (30-60 minutos), dejando así que se produjera la reacción proteolítica. Terminada la reacción, la electroforesis se arrancó de nuevo y se dejó transcurrir hasta su término. Los fragmentos peptídicos se visualizaron mediante tinción del gel con plata según fue descrito en el apartado 2.4.3.2. Tanto los tiempos de digestión como la cantidad de proteasa V8 empleada en cada caso se especifican en la sección de resultados en el correspondiente pie de figura. La cantidad óptima de proteasa V8 fue determinada mediante digestión de catalasa de hígado de rata con cantidades crecientes de esta proteasa, hasta observar digestión del sustrato sin aparición de las bandas correspondientes a la proteasa (Fig. 4.4A)

4.2.8.2. Digestión con tripsina.

La digestión con tripsina se efectuó a partir de la proteína obtenida de geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y secos. Para ello, se recortó el trozo de gel que contenía la proteína de nuestro interés y se rehidrató y equilibró mediante incubación de éste con NH_4HCO_3 20 mM pH 8/metanol (1:1 v/v) con varios cambios, hasta que el pH de los lavados fue de aproximadamente 8.4. A continuación, las bandas se lavaron varias veces con NH_4HCO_3 20 mM pH 8.4 para eliminar el exceso de metanol y se inició la reacción añadiendo tripsina disuelta en NH_4HCO_3 20 mM pH 8.4. El tiempo de reacción así como la cantidad de tripsina empleada en cada caso se especifican en los correspondientes pies de figura. Una vez finalizada la digestión, la muestra se congeló en N_2 líquido y se liofilizó. El análisis de los fragmentos peptídicos correspondientes se efectuó mediante SDS-PAGE y tinción con AgNO_3 o mediante HPLC en fase reversa.

4.2.8.3. Digestión con *N*-cloro succinimida

Se siguió el métodos descrito por Lischwe y Ochs (1982) para la digestión de proteínas previamente fraccionadas mediante SDS-PAGE. Este agente, en presencia de elevadas concentraciones de urea, rompe exclusivamente los enlaces peptídicos situados en posición carboxilo de triptófanos. Las bandas correspondientes a la proteína de

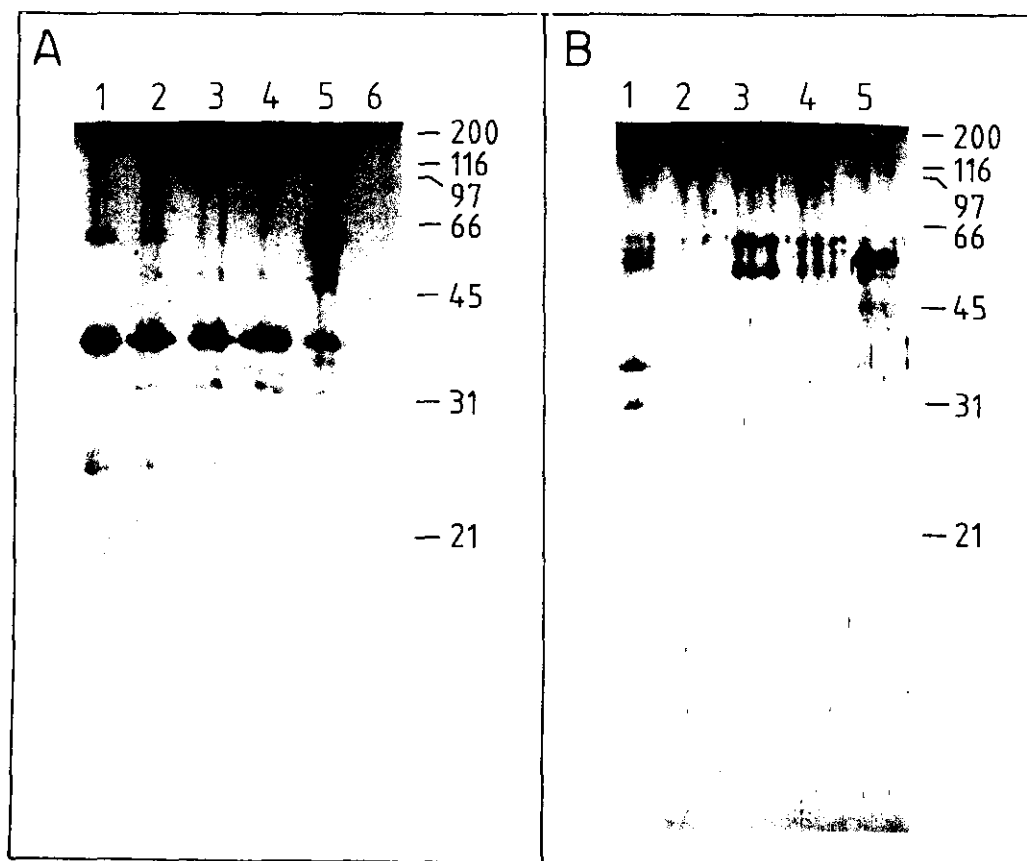


FIGURA 4.4. Determinación de las condiciones óptimas para la digestión de proteínas previamente fraccionadas mediante SDS-PAGE, empleando proteasa V8 (Cleveland y col., 1977) y N-cloro succinimida (Lischwe y Ows, 1982).

Como sustrato de las digestiones proteolíticas, se emplearon en ambos casos 5 μ g de catalasa de eritrocito de rata, previamente purificada mediante centrifugación en gradientes de densidad de glicerol (15-50%) (ver Materiales y Métodos) y SDS-PAGE. La banda correspondiente a catalasa fue localizada en los geles mediante tinción con azul de Coomassie. En ambos casos, los fragmentos peptídicos resultantes fueron analizados mediante SDS-PAGE en geles del 15% y tinción con plata (Ansorge y col., 1985).

A. Digestión de catalasa con 5 (carril 1), 10 (carril 2), 50 (carril 3) y 100 ng (carril 4) o en ausencia de proteasa V8. La digestión con 100 ng de proteasa en ausencia de sustrato (carril 6) permitió descartar la posible existencia de fragmentos peptídicos procedentes de la proteasa. B. Digestión de catalasa con 1,5 (carril 1), 15 (carril 2), 75 (carril 3) y 150 mM (carril 4) o en ausencia (carril 5) de N-cloro succinimida.

nuestro interés se recortaron del gel teñido y seco y se hidrataron mediante 3 lavados de 30 minutos con H₂O. A continuación se equilibraron las bandas con una mezcla de urea:acético:H₂O (1:1:1, p/v/v) durante 40 minutos a temperatura ambiente con un cambio de medio. A continuación, se añadieron 5 ml del mismo medio conteniendo N-cloro succinimida en la concentración especificada en cada caso y se dejó proceder la

reacción durante 30 minutos. Finalmente, las bandas se lavaron con agua durante 30 minutos y se equilibraron con tampón de ruptura durante 5 minutos a 95 °C. Los productos resultantes se analizaron mediante SDS-PAGE en geles del 15% y tinción con plata. Las condiciones óptimas para la proteólisis con este agente fueron determinadas mediante digestión de catalasa de eritrocitos de rata con distintas concentraciones de N-cloro succinimida y observación del perfil de los fragmentos peptídicos resultantes mediante SDS-PAGE y tinción con plata (Fig. 4.4B)

4.2.8.4. *Digestion con bromuro de cianogeno.*

Las digestiones con CNBr se efectuaron a partir de polipéptidos previamente fraccionados mediante SDS-PAGE. Este agente rompe exclusivamente los enlaces peptídicos situados en posición carboxilo con respecto a los residuos de metionina. La banda que contenía la proteína que deseábamos digerir se recortó del gel teñido con azul de Coomassie y seco y se hidrató en 100 µl de ácido fórmico al 70%. A continuación, se añadió CNBr (concentración final aproximada de 1M) y se incubó durante 24h. a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez finalizada la digestión, se añadieron a la mezcla 900 µl de agua destilada y se liofilizó. Al residuo seco resultante se le añadió 1 ml de agua y se volvió a liofilizar. El residuo seco resultante de la segunda liofilización fue directamente resuspendido en tampón de carga de electroforesis. Los fragmentos peptídicos resultantes se visualizaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata.

4.2.8.4. *Análisis de mezclas peptídicas mediante HPLC en fase reversa.*

Para el análisis de péptidos mediante HPLC en fase reversa se empleó un HPLC Beckmann System Gold con una columna de fase reversa C18, acoplado a un detector monocromático Beckmann y a un colector de fracciones Pharmacia. El funcionamiento correcto del sistema se comprobó mediante análisis de los patrones Sigma de HPLC en las mismas condiciones de elución que las descritas posteriormente para la muestra. La muestra a analizar fue liofilizada y resuspendida en 50 µl de agua milliQ (millipore) con TFA al 0.1%. A continuación se centrifugó durante 15 minutos en una microfuga para eliminar los restos insolubles que pudieran dañar a la columna. La muestra se inyectó y se efectuó en primer lugar una elución isocrática con agua-TFA 0.1% conteniendo un 1.4 % de acetonitrilo-TFA 0.085% a 0.5 ml/min hasta estabilización de la línea base. A continuación se efectuó una elución en gradiente con agua-TFA 0.1% (A) y acetonitrilo-TFA 0.085% (B) con el siguiente perfil: de 1.4% a 30% de B en 60 minutos, de 30% a 60% de B en 30 minutos, de 60% a 78% de B en 15 minutos y de 78% a 1.4% de B en 5

minutos. Se mantuvo un flujo de 0.5 ml/min durante todo el gradiente. Los péptidos fueron detectados mediante determinación de la densidad óptica a 214 nm en un rango de 0.1 AUFS.

4.2.8.5. *Microsecuenciación de fragmentos peptídicos.*

La preparación de las muestras para microsecuenciación se efectuó mediante inmunoprecipitación, fraccionamiento de los productos de inmunoprecipitación en SDS-PAGE, transferencia a PVDF con tampón CAPS 10 mM pH 11, metanol 10% (v/v) durante 30 minutos a 1 mA/cm² de superficie de gel y tinción de la membrana con negro amido para visualizar la proteína. El fragmento de membrana fue recortado y enviado al Dr. Vandeckerckhove (Rijksuniversitat Gante, Bélgica). La membrana fue incubada con 500 µl de PVP 0.2% (p/v) en metanol para bloquear uniones inespecíficas y posteriormente lavada 4 veces con 500 µl de H₂O y 2 veces con 500 µl de Tris-HCl 0.1 M pH 8. A continuación, la membrana se incubó con tripsina (Boehringer, grado de secuenciación) en ese mismo tampón con una concentración final de 0.01 mg/ml y se incubó durante 4 horas a 37 °C. El sobrenadante de la digestión fue transferido a otro tubo y los péptidos retenidos en la membrana se eluyeron con 100 µl de ácido fórmico al 80%. El sobrenadante y los eluatos, conteniendo los péptidos tripticos resultantes, se fraccionaron mediante HPLC en fase reversa con una columna C18 de 25 cm de longitud. La columna fue equilibrada en un 95% de agua-TFA 0.1% (A) y un 5% de acetonitrilo-TFA 0.1% (B). Los péptidos se eluyeron mediante un gradiente de 90 minutos en el que se pasaba de un 5% inicial a un 80% final de B. Los péptidos fueron detectados en un espectrofotómetro acoplado al HPLC a 214 nm y una sensibilidad de 0.2 AUFS. Las fracciones que contenían picos aislados de absorbancia a 214 nm fueron aplicadas directamente a un secuenciador en fase líquida Applied Biosystems.

4.2.9. **Estudio del grado de glicosilación de polipéptidos inmunoprecipitados.**

Los complejos antígeno-anticuerpo obtenidos en el sedimento tras la inmunoprecipitación directa fueron resuspendidos en 50 µl de un tampón de composición: fosfato sódico 0,1M pH 6,1; Triton X-100 1%, acetato cálcico 0,1M, leupeptina 10 µg/ml y PMSF 0,1 mM. A continuación se añadió 1 unidad de neuraminidasa de *Arthrobacter urefaciens* y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Una vez finalizada la reacción, las muestras fueron congeladas con N₂ líquido y liofilizadas. El residuo seco se resuspendió directamente en el tampón de carga de isoelectroenfoque.

Los productos resultantes del tratamiento se visualizaron mediante electroforesis bidimensional y tinción con plata.

4.2.10. Estudios de plegamiento proteico *in vitro*.

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Viitanen y col., (1992). Las proteínas de la fracción citosólica de hígado de rata (apartado 2.1.5) a una concentración de 123 μ M fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en un tampón de composición Tris-HCl 80 mM pH 7.4, DTT 4.2 mM, Tween 20 0.008% en presencia o ausencia de urea 8M. A continuación, las muestras fueron diluidas 100 veces en un tampón de composición Tris-HCl 45 mM pH 7.7, DTT 3.6 mM, MgCl₂ 7.3 mM, KCl 7.3 mM y Tween 20 0.008% e incubadas durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de proteína y urea en la muestra fueron por tanto de 1.23 μ M y 80 mM, respectivamente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 15.000xg (12.000 rpm en microfuga) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado fue directamente resuspendido en tampón de carga de electroforesis y al sobrenadante se le añadieron 0.1 volúmenes de TCA 100% y tRNA de levadura hasta concentración final de 0.25 mg/ml. Tras incubación en hielo durante 1 h, los sobrenadantes fueron centrifugados a 15.000xg (12.000 rpm en microfuga) durante 10 minutos a 4°C. El precipitado fue resuspendido en tampón de carga de electroforesis y neutralizado con Tris base 2M. Las muestras correspondientes a los sobrenadantes y a los precipitados fueron fraccionadas mediante SDS-PAGE al 10% y las proteínas visualizadas mediante tinción con Coomassie.

4.2.11. Análisis en electroforesis bidimensional del procesamiento de precursores mitocondriales.

Las mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas mediante centrifugación diferencial (apartado 4.2.1.2.1). El pellet resultante fue resuspendido en 1 ml de Tris 10 mM pH 7.4 y sometido a 3 ciclos de congelación/descongelación. La proteína fue cuantificada mediante el método de Bradford y el lisado mitocondrial fue dividido en alícuotas y liofilizado.

Por otro lado, RNA poliadenilado de hígado de rata (apartado 2.14.1) fue traducido *in vitro* con 200 μ l de lisado de reticulocitos tratados con RNasa en presencia de 0.4 mCi de [³⁵S]metionina durante 1 hora a 30 °C. Los productos de traducción resultantes fueron incubados con cantidades crecientes de extracto mitocondrial hepático

durante 1 hora a 30 °C. Las muestras fueron liofilizadas y conservadas a -20°C hasta su procesamiento mediante IEF/SDS-PAGE o NEPHGE/SDS-PAGE.

4.2.12. Técnicas de microscopía.

4.2.12.1. *Microscopía de inmunofluorescencia indirecta.*

Células NRK (Normal Rat Kidney) fueron crecidas hasta semiconfluencia sobre cubres circulares en DMEM completo suplementado con un 10% de suero de ternera fetal. Las células se fijaron con metanol absoluto a -20 °C. Los cubres se incubaron a continuación con unas pocas gotas de antisuero a distintas diluciones o suero preinmune según se especifica en los correspondientes pies de figura durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C con un anticuerpo contra la fracción Fc de las inmunoglobulinas de conejo conjugado a fluoresceína (TAGO Immunochemicals). Por último, los cubres se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Gelvatol™. El microscopio de fluorescencia utilizado fue un Zeiss Axiovert 35.

4.2.12.2. *Microscopía electrónica.*

Las muestras de hígado de rata se procesaron según se ha descrito recientemente (Cuezva y col. 1990). Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 1% en PBS y ácido tánico al 2% a temperatura ambiente durante 1 hora. Se deshidrataron con etanol y se embebieron en Lowicryl K4M. El paso inicial de deshidratación se realizó a 4 °C, para a continuación, someterlas a etanol al 50%, y por último, mantenerlas a -20 °C. Las resinas se polimerizaron por irradiación con luz ultravioleta durante 48 horas a -20 °C y de 24 a 48 horas a temperatura ambiente. Secciones de muestra se adherieron a una rejilla, que se embebió en una gota de ovoalbúmina 1% en PBS durante 15 minutos a 25 °C. Después la rejilla se transfirió a una gota del antisuero correspondiente o suero preinmune según se indica en el pie de figura correspondiente y se incubó durante 12-16 horas a 4 °C. Posteriormente, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando con PBS. Las rejillas se trataron con ovoalbúmina al 1% y proteína A conjugada con oro en PBS durante 1 hora a 25 °C. A continuación, se lavó con agua, se secó y se tiñó con acetato de uranilo saturado, volviendo a lavarlas con agua. Por último, las rejillas con las correspondientes muestras se examinaron con un microscopio electrónico JEOL 100B.

4.2.13. Purificación de ácidos nucleicos.

4.2.13.1. *Aislamiento de RNA de hígado de rata y RNA poli A⁺*

El RNA total de hígado de rata se aisló siguiendo el protocolo descrito por García-Ruiz y col. (1978). La purificación de la fracción poliA⁺ del RNA se realizó mediante cromatografía de afinidad en columnas de oligo (dT) celulosa (Boehringer-Manheim, Alemania) según el método descrito por Aviv y Leder (1972).

4.2.13.2. *Aislamiento de DNA plasmídico.*

La preparación de DNA plasmídico tanto a escala preparativa (a partir de 250 ml de cultivo saturado) como a escala analítica ("minipreps" de 5 ml de cultivo saturado) se efectuó por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979).

4.2.13.3. *Aislamiento de dna del fago λ gt11.*

Se realizó según el protocolo descrito por Maniatis y col. (1989).

4.2.14. Electroforesis de ácidos nucleicos.

4.2.14.1. *Electroforesis de RNA*

El RNA total o la fracción de poli A⁺ se fraccionó en geles de agarosa del 1% conteniendo formaldehído (Thomas, 1980). Posteriormente, se tiñeron los geles con bromuro de etidio para comprobar la migración electroforética de los RNAs ribosómicos (28S-4.100 b y 18S-1.800 b), así como para confirmar que en todos los casos se fraccionó la misma cantidad de RNA total.

4.2.14.2. *Electroforesis de DNA.*

La electroforesis de DNA se realizó en geles de agarosa (entre 0.7% y 1%) de longitud variable en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM. EDTA 2mM). La calibración de los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de una mezcla de fragmentos de DNA de longitud conocida, resultantes de la digestión del DNA del fago λ con las endonucleasas HindIII (23.6, 9.6, 6.6, 4.3, 2.3, 2, 0.6 y 0.14 kbp) o EcoRI y HindIII (21.2; 5.1, 4.9, 4.2, 3.5, 2, 1.9, 1.5, 1.33, 0.9, 0.8, 0.5 y 0.1 kbp)

4.2.15. Manejo de genotecas de cDNA de hígado de rata.

4.2.15.1. *Síntesis de una genoteca de cDNA de hígado de rata.*

La síntesis de cDNA a partir de RNA poli A⁺ de hígado de rata de 6 horas de vida se llevó a cabo siguiendo el método de Gubler y Hoffmann (1983), basado en la síntesis de la primera cadena con transcriptasa reversa de AMV con oligo(dT) como "primer" y de la segunda cadena con RNasa H (Boehringer-Manheim, Alemania) y DNA pol I de E.coli. Los cDNAs así obtenidos fueron ligados al plásmido pUC18 previamente linealizado con BamHI, tratado con fosfatasa alcalina y con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I para conseguir extremos romos. Los plásmidos recombinantes así obtenidos fueron usados para transformar bacterias competentes de la cepa DH5 (eficacia transformación 6×10^6 col/ μ g de DNA). El "screening" de esta genoteca se efectuó según el método descrito por Grunstein y Hogness (1975) para la transferencia del DNA de las colonias transformantes a filtros de nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro y posterior hibridación de éstos con un oligonucleótido marcado radiactivamente correspondiente a la secuencia del cDNA de las subunidades α o β del complejo F1-ATPasa (Garboczi y col., 1988; Lee y col., 1990). El porcentaje de clones recombinantes fue muy bajo y nulo el número de clones positivos en el "screening", por lo que esta genoteca se deshechó.

4.2.15.2. *"Screening" de una genoteca de expresión de cDNA de hígado de rata.*

Para este fin, se emplearon 2 genotecas de cDNA de hígado de rata en el vector λ gt11, una de ellas cedida por el Dr. González Castaño (Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid) y la otra, adquirida a Clontech (Palo Alto, California, Estados Unidos). En ambos casos nos basamos en la capacidad del vector lambda gt11 para expresar el inserto de cDNA exógeno durante el ciclo lítico de infección, lo que permite la detección de clones positivos mediante el uso de anticuerpos específicos para la proteína codificada por el gen de nuestro interés. Básicamente, los procedimientos que se han empleado para el "inmunoscreening" han sido: infección de células de *Escherichia coli* de la cepa Y1090 con λ gt11, plaqueo, transferencia de los productos de expresión de las placas de lisis a los filtros de nitrocelulosa e incubación sucesiva de éstos con un anticuerpo policlonal capaz de reconocer a las subunidades α y β del complejo mitocondrial F1-ATPasa y su posterior detección con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa. El "screening" de ambas genotecas también se efectuó mediante hibridación de los filtros con un oligonucleótido de 25-mer de polaridad

positiva complementario a una región 5' del mensajero de la subunidad α del complejo F1-ATPasa de mitocondria de hígado de rata (Lee y col. 1990), con el que no se obtuvo resultado positivo.

Tras la identificación de clones positivos por "inmunoscreening" y la purificación de éstos hasta homogeneidad, se procedió al aislamiento del DNA del fago λ gt11 y liberación del inserto de cDNA para su posterior subclonaje en el vector plasmídico Bluescript (Stratagene). La selección de transformantes se realizó por resistencia al antibiótico ampicilina y los recombinantes fueron identificados por la coloración blanca de la colonia en un medio con el cromógeno X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) y el inductor del operon lac IPTG (Isopropil β -D-galactopiranosido).

Todas las manipulaciones básicas del DNA (digestiones con endonucleasas de restricción, defosforilaciones, ligaciones, etc.) se realizaron según los protocolos recomendados por el proveedor de los enzimas o según Maniatis y col. (1989). La cuantificación del DNA se realizó por comparación de la intensidad de fluorescencia con patrones de concentración conocida, después de electroforesis en geles de agarosa del 1% teñidos con bromuro de etidio.

4.2.16. Análisis de mensajeros.

4.2.16.1. *Northern blot.*

Los RNAs fraccionados mediante electroforesis desnaturizante (apartado 2.13.1) se transfirieron a una membrana de GeneScreen (DuPont-NEN Research Products, Massachusetts, Estados Unidos) empleando un equipo de transferencia mediante vacío (LKB 2016 VacuGene Vacuum Blotting System) durante 2 horas a 10 mmHg de presión.

4.2.16.2 *Marcaje de sondas de DNA.*

Para el marcaje radiactivo de las sondas, aproximadamente 250 ng de DNA se marcaron con 50 μ Ci de [α - 32 P]-dCTP según el protocolo de "nick-translation" descrito por Rigby y col., (1977). La separación de los nucleótidos no incorporados se realizó mediante una columna de centrifugación de Sephadex G-50, según el protocolo descrito por Maniatis y col. (1989).

4.2.16.3. *Hibridación.*

Después de fijar el RNA a la membrana durante 2 horas a 80°C, se prehibridó con 20 ml de una mezcla de composición: formamida desionizada 50% (v/v), DNA de esperma de salmón desnaturalizado 0.1 mg/ml, Pipes 20 mM pH 6,4, NaCl 0.8M, EDTA 2 mM y SDS 0.5%, durante 90 minutos a 42 °C. La hibridación se efectuó en 10 ml de la misma mezcla a la que se añadieron 100 µl de sonda marcada e incubación durante 1 hora a 60 °C y 48 horas a 42 °C. Tras la hibridación, se lavó la membrana 1 vez durante 10 minutos con 100 ml de 2xSSC a temperatura ambiente y 30 minutos con 100 ml de 0.1xSSC y SDS 0.1% a una temperatura de 5 °C por debajo del punto de fusión teórico del híbrido oligonucleótido-mRNA ($T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$). La membrana así lavada se expuso a una película radiográfica AGFA (X-ray Film RP-2) a -70 °C durante distintos tiempos con dos pantallas amplificadores de tungstato (Dupont Cronex Lighting Plus XL)

4.2.17. **Secuenciación de DNA.**

Las secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos pAJ1 y pAJ2 se realizó utilizando el método de terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato desarrollado por Sanger (1977), realizado directamente sobre DNA de doble cadena previa desnaturalización de éste en medio alcalino.

La separación de los productos de secuenciación se realizó en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida 6% (20:1) y urea 7M. El tampón de electroforesis empleado fue TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 8 mM).

4.2.18. **Análisis asistido por ordenador de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos.**

4.2.18.1. *Análisis de estructura de proteínas.*

4.2.18.1.1. Estructura primaria. Alineamientos.

Todas las secuencias analizadas fueron extraídas del banco de datos de la NBRF (National Basic Research Foundation) o de Swissprot. Las comparaciones de 2 secuencias se efectuaron mediante los algoritmos de Needleman y Wunsch (1970) y de Smith y Waterman (1981), implementados respectivamente en los programas GAP y

BESTFIT del paquete de software del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (UWGCGSP) (Deveraux y col., 1984). El alineamiento de múltiples secuencias proteicas pertenecientes a una misma familia (chaperoninas, subunidades α y β de las F-ATPasas y subunidades A y B de las V-ATPasas) se realizó con los programas MULTALIN y PILEUP, este ultimo basado en el algoritmo de Sneath y Sokal (1973) y también perteneciente al UWGCGSP. Cuando se compararon proteínas de distintas familias con baja similitud global de secuencia, los alineamientos se efectuaron mediante inspección visual.

La identificación de motivos conservados en un grupo de secuencias, así como de duplicaciones dentro de una misma secuencia se efectuó con el programa MOTIF.

El alineamiento múltiple de secuencias entre varias familias proteicas permitió la identificación de regiones altamente conservadas entre todas las familias. Estas regiones fueron usadas como consensos para efectuar búsquedas en el banco de datos con el fin de identificar secuencias relacionadas. Para ello, se empleó el algoritmo de Wilbur y Lipman (1983), implementado en el programa WORDSEARCH del UWGCGSP. La existencia en dichas regiones consenso de posiciones con residuos absolutamente conservados y amino ácidos variables fue simulado utilizando la opción /MASK del programa WORDSEARCH durante la búsqueda.

El cálculo del porcentaje de similitud e identidad de secuencia en una determinada familia de proteínas se efectuó mediante comparación de todas las proteínas de esa familia de 2 en 2 con el programa BESTFIT (Smith y Waterman, 1981) y posterior cálculo de la media aritmética y error estandar de la media con todos los valores obtenidos.

4.2.18.1.2. Estructura secundaria.

Para la predicción de estructura secundaria de proteínas, se emplearon los 2 algoritmos más eficaces descritos hasta la fecha. Estos son los de Garnier-Osguthorpe-Robson (1978) y de Chou-Fasman (1978), implementados en el programa PEPTIDESTRUCTURE del UWGCGSP. Con el fin de obtener la conformación más probable para cada residuo, se analizaron conjuntamente las predicciones para cada uno de las proteínas estudiadas. De esta forma, disponiendo del alineamiento de estructura primaria, es posible asignar un estado conformacional a cada posición aminoacídica en la familia, promediando el estado conformacional predicho para cada una de las secuencias individuales en esa posición. De la misma forma, cuando los 2 algoritmos anteriormente

mencionados proporcionaban resultados contradictorios, se asumió como estado conformacional más probable el proporcionalmente más abundante en esa posición para cada familia de proteínas.

La identificación de α -hélices anfifílicas dentro de cada secuencia se efectuó mediante representación helicoidal de las características físico-químicas que definen a los aminoácidos proteinogénicos (hidrofobicidad, carga eléctrica neta y polaridad)

4.2.18.2. *Análisis de secuencia de ácidos nucleicos.*

La identificación de los clones obtenidos durante el "screening" de la genoteca de cDNA de hígado de rata fue efectuado mediante comparación de la secuencia obtenida con todas las secuencias de DNA incluidas en el banco de datos del GenEMBL, usando el programa FASTA (Person y Lipmann, 1988) del UWGCGSP.

ABRIR CAPÍTULO 5

